

Myokardiale Veränderungen der MMPs, TIMPs, Prokollagene und Kollagene bei verschiedenen Herzerkrankungen

**Inauguraldissertation
zu Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Ivo Michael Urs Löffler
aus Würzburg**

Gießen 2009

**Aus dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung
(W.G. Kerckhoff-Institut)
Direktor Prof. Dr. Dr. Braun
in Bad Nauheim**

**Gutachter: PD. Dr. S. Costin
Gutachter: Prof. Dr. H. Tillmanns**

Tag der Disputation: 8.12.2009

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung/ Überblick und Ziele der Untersuchung</u>	7
<u>1.1 Die Extrazelluläre Matrix</u>	7
<i>1.1.1 Faserproteine</i>	9
1.1.1.1 Strukturproteine	9
1.1.1.2 Anheftungsproteine (Adhäsionsproteine)	10
<i>1.1.2 Proteoglykane</i>	11
<i>1.1.3 Proteasen der ECM</i>	11
<i>1.1.4 Matrix-Metalloproteinasen</i>	12
1.1.4.1 Aktivierung („Cystein switch“)	12
1.1.4.2 Einteilung der Matrix-Metalloproteasen	13
1.1.4.3 Struktur der MMPs	15
1.1.4.4 Aufgaben der Matrix-Metalloproteinasen	19
1.1.4.5 Regulierungen der MMP-Expressions (Signalinduktionsweg)	19
<i>1.1.5 Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen</i>	20
1.1.5.1 Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinases (TIMPs)	20
1.1.5.2 Andere Inhibitoren der MMPs	22
<i>1.1.6 Vorstellung und kurze Einführung in spezielle Krankheitslehre des Herzens</i>	22
1.1.6.1 Dilatative Kardiomyopathie (Dilated Cardiomyopathy, DCM)	22
1.1.6.2 Koronare Herzerkrankung (Ischemic cardiomyopathy, Ischämische Herzerkrankung, KHK, ICM)	23
1.1.6.3 Myokarditis (Myocarditis, MYO)	24
<i>1.1.7 Ziel der Arbeit</i>	25

<u>2. Material und Methoden</u>	26
<u>2.1 Gewebe, Patientengruppen, Gewebeherkunft und Aufbewahrung</u>	26
2.1.1 Patientengruppen	26
2.1.2 Gewebe	26
2.1.3 Gewinnung und Aufbewahrung	27
<u>2.2 Herstellung und Färbung der Präparate</u>	27
2.2.1 Hämatoxilin-Eosin-Präparate (HE-Färbungen)	28
2.2.2 Immunhistologisches Anfärben und Präparatherstellung	29
2.2.2.1 Testfärbungen und Standardisierungen der Färbetechnik	30
2.2.2.2 Färbungsschemata der Untersuchung/Einfach- oder Einzelfärbung	30
2.2.2.3 Doppel – Färbungen	33
2.2.3 Verwendete Antikörper	35
2.2.3.1 Verwendete 1. Antikörper	36
2.2.3.2 Verwendete 2. Antikörper	37
2.2.3.3 Verwendete 3. Antikörper	37
2.2.3.4 Kernfarbstoffe	38
2.2.4 Lagerung der Schnitte	38
<u>2.3 Mikroskopie und Bildaufnahme</u>	38
2.3.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	38
2.3.1.1 Lichtmikroskopie	38
2.3.1.2 Fluoreszenzmikroskopie	39
2.3.1.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	39
2.3.1.4 Herstellung von Bildern, welche später zur Quantifizierung benutzt wurden	40
2.3.1.5 Herstellung von konfokalen Fluoreszenz-Bildern für die Beurteilung der Zusammenhänge der spezifischen Strukturen	41

<u>2.4 Messung der Fluoreszenzintensität und</u>	
<u>Quantifizierung</u>	42
<i>2.4.1 Messverfahren, Messung, Quantifizierung und statistische Auswertung</i>	42
<i>2.4.1.1 Messverfahren und Messung</i>	42
<i>2.4.1.2 Quantifizierung und statistische Auswertung</i>	42
<u>3. Ergebnisse</u>	43
<u>3.1 Immunhistologische Färbungen und HE-Färbung</u>	43
<i>3.1.1. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)</i>	43
<i>3.1.2 Verschiedene MMPs in Verbindung mit Smooth Muscle α-Actin, CD3, CD 68 und Vimentin</i>	44
<i>3.1.3 Färbungen mit aminoterminalen Telopeptid vom Typ III Collagen (IHINTP)</i>	45
<i>3.1.4 Darstellung von Kollagen I und Kollagen III</i>	46
<u>3.2 Quantitative Auswertung und Darstellung</u>	47
<i>3.2.1. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)</i>	47
<i>3.2.1.1 MMP 2</i>	47
<i>3.2.1.2 MMP 8</i>	48
<i>3.2.1.3 MMP 9</i>	48
<i>3.2.1.4 MMP 19</i>	49
<i>3.2.2. Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs)</i>	50
<i>3.2.2.1 TIMP 1</i>	50
<i>3.2.2.2 TIMP 2</i>	50
<i>3.2.2.3 TIMP 3</i>	51
<i>3.2.2.4 TIMP 4</i>	51
<i>3.2.3 Kollagene und Prokollagene</i>	52
<i>3.2.3.1 ICPT</i>	52
<i>3.2.3.2 PINP</i>	52
<i>3.2.3.3 PIINP</i>	53

3.2.3.4 IIIINTP	53
3.2.3.5 Kollagen I	54
3.2.3.6 Kollagen III	54
3.2.3.7 Verhältnis von Kollagen III zu Kollagen I	55
3.2.3.8 Verhältnis von Kollagen III/Kollagen I zu linksventrikulärem enddiastolischem Druck	55
3.2.3.9 Verhältnis von Kollagen I zu linksventrikulärem enddiastolischem Druck	56
3.2.3.10 Verhältnis von Kollagen III zu linksventrikulärem enddiastolischem Druck	56
<u>4. Diskussion</u>	57
<u>4.1 MMPs und TIMPs bei Herzerkrankungen</u>	57
4.1.1 MMPs	57
4.1.2 TIMPs	60
4.1.3 Prokollagene und Kollagene	61
<u>4.2 Vorstellung des bisherigen Schemas und unserer schematischen Darstellung zur Erklärung der Befunde und Zusammenhänge nach unseren Vorstellungen</u>	62
4.2.1 Grundschema des MMP/TIMP-Kollagensystems im Herzen	66
<u>4.3 Schlußfolgerungen und mögliche klinische Aussichten oder Blick in die Zukunft</u>	68
<u>5. Zusammenfassung</u>	70
<u>6. Summary</u>	72
<u>7. Anhang/Rezepte</u>	74
<u>8. Literaturverzeichnis</u>	76
<u>9. Lebenslauf</u>	84
<u>10. Danksagung</u>	86

1. Einleitung/ Überblick und Ziele der Untersuchung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der extrazellulären Matrix (ECM) für die Entstehung von strukturell-funktionellen Veränderungen bei Herzerkrankungen verschiedener Pathogenese dargestellt werden.

1.1 Die Extrazelluläre Matrix

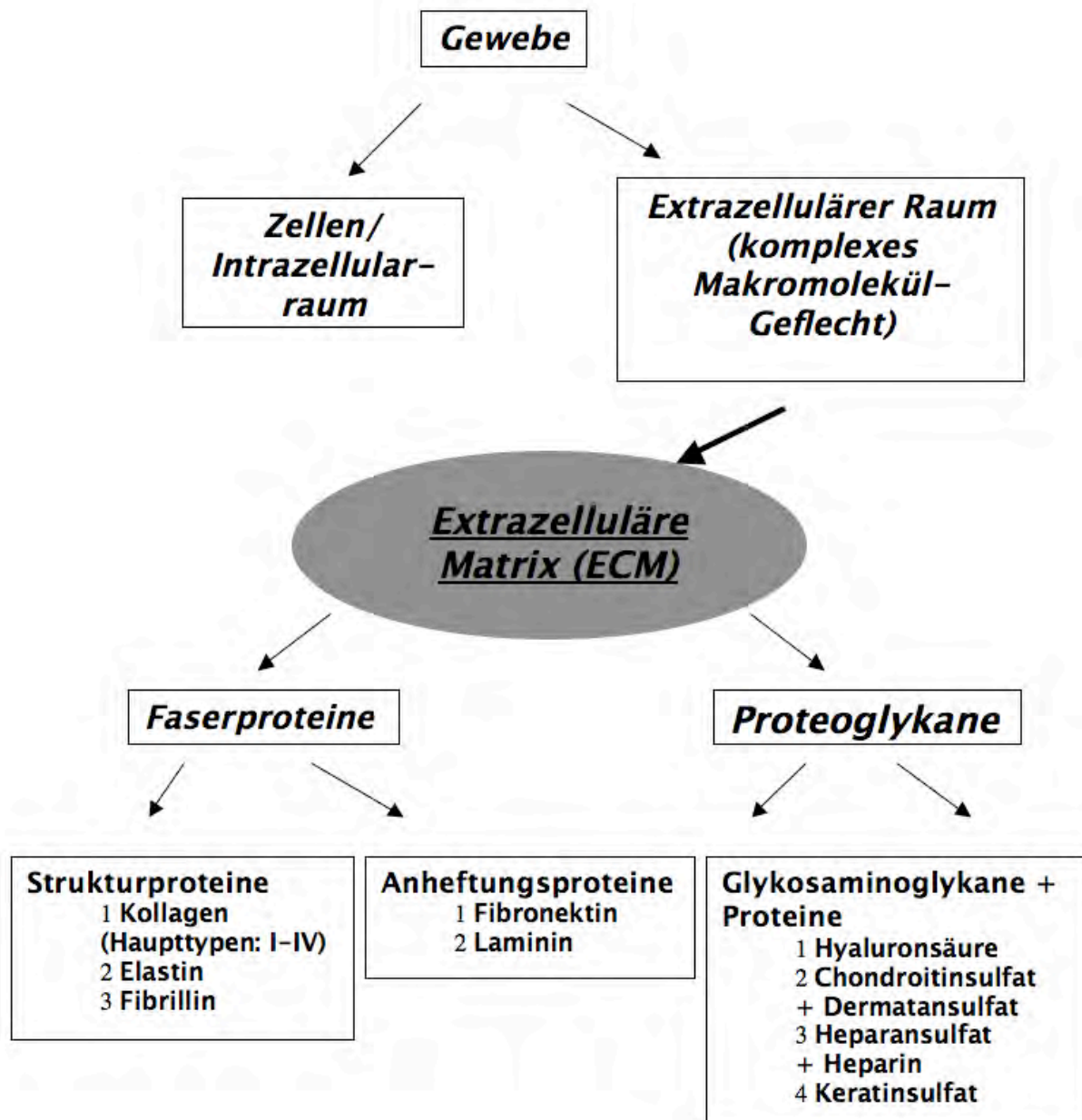
Als extrazelluläre Matrix (Interzellulärsubstanz, EZM oder ECM) wird das Bindegewebe bezeichnet, welches zwischen den Zellen im Interzellularraum liegt. Sie besteht aus vielen verschiedenen Komponenten. Diese Bestandteile werden in zwei Untergruppen aufgeteilt: Grundsubstanz und Fasern. Welche Gruppe überwiegt oder in welchem Verhältnis sie zueinander vorliegen, wird von der Örtlichkeit und den dort wirkenden Faktoren beeinflusst.

Die ECM kommt in allen Gewebetypen vor und bestimmt die Eigenschaften des entsprechenden Gewebes mit. Früher betrachtete man die ECM als gewebsinternes Stützgerüst und Wasserspeicher. In der jüngeren Zeit stellte sich jedoch heraus, dass die ECM viel mehr ist [1]. Sie besteht aus vielen Makromolekülen, welche sich außerhalb der Zellen im Interzellularraum befinden und zum Teil ein Molekülgeflecht bilden. Diese Moleküle interagieren mit den Zellen und untereinander. Es kommt dadurch zu einem ständigen Wandel der ECM, die sich den Bedürfnissen des entsprechenden Gewebes und den dort herrschenden Bedingungen anpasst. Normalerweise herrscht in der ECM ein Gleichgewicht zwischen Ab- und Aufbauprozessen. Die sind bei vielen physiologischen Prozessen wichtig. So verändert sich beim Wachstum, bei der Wundheilung oder beim Remodelling die Aktivität und Konzentration der einzelnen Komponenten der ECM.

Wichtige Bestandteile der ECM sind Faserproteine wie Kollagen oder Elastin und Proteoglykane wie Decorine oder Aggrecane [1] (Siehe Abbildung 1). Speziell im Knochengewebe sind auch anorganische Bestandteile in der ECM enthalten.

Diese eingebauten Hydroxylapatitkristalle verleihen dem Knochen eine verstärkte Festigkeit gegenüber Druck oder anderen äußeren Einflüssen.

Abbildung 1 (Abb. 1) Klassifizierung der extrazellulären Matrixmoleküle



1.1.1 Faserproteine

Sie werden nach ihren Aufgaben und ihrer Struktur in zwei Hauptgruppen eingeteilt.

Diese sind folgende:

1. Strukturproteine

- Kollagene
- Elastine
- Fibrilline

2. Anheftungsproteine

- Fibronectin
- Laminin
- Vitronectin

Kollagene sind die Hauptproteine der extrazellulären Matrix und äußerst wichtig für das Molekülgeflecht und dessen Veränderungen bei allen Umbauprozessen.

1.1.1.1 Strukturproteine

Zur Zeit sind 27 verschiedene Kollagene bekannt, welche sich durch Struktur und Eigenschaften unterscheiden. In der ECM gibt es vier Kollagene (I-IV), welche eine entscheidende Rolle spielen, wobei die Kollagen I-III vom fibrillären Typ sind und das Kollagen IV vom nicht-fibrillären Typ ist. Kollagen I weist eine starrere Struktur auf als Kollagen III. Es ist stabilisierender für das Gewebe als Kollagen III. Beim Kollagen IV ist noch wichtig zu erwähnen, dass es ein netzbildendes Kollagen ist, welches am Aufbau der Basalmembran entscheidend mitwirkt.

Die anderen Kollagene, wie Fibrillenassoziierte-, Perlenschnurartige-, Verankerungskollagene oder Kollagene mit Transmembrandomänen sollen hier nur erwähnt werden. Aus Kollagen I-IV entstehen verschiedene Fasertypen im ECM. Es können z.B. Kollagenfasern (aus Kollagen I), retikuläre Fasern (aus Kollagen III) entstehen.

Die Elastine und Fibrilline können elastische Fasern mit ausbilden und verleihen dem entsprechenden Gewebe so eine besondere reversible Dehnbarkeit.

Tabelle 1 (Tab. 1) Übersicht der wichtigsten Kollagene

Kollagentypen	Gruppe	Lokalisation
I	Fibrilläres Kollagen	Haut, Sehnen, Knochen, Cornea, innere Organe
II	Fibrilläres Kollagen	Knorpel, Bandscheibe, Glaskörper des Auges
III	Fibrilläres Kollagen	Haut, innere Organe, Gefäße
IV	Netzbildendes Kollagen	Basalmembran
V	Fibrilläres Kollagen	Haut, Muskel
VI	Perlenschnurartiges Kollagen	Mikrofibrillen
VII	Verankerungsfibrillen	ECM
VIII	Netzbildendes Kollagen	Endothelzellen
IX	Fibrillenassoziiertes Kollagen	Knorpel
X	Netzbildendes Kollagen	Knorpel (Hypertrophie)
XI	Fibrilläres Kollagen	Knorpel
XII	Fibrillenassoziiertes Kollagen	Knorpel

1.1.1.2 Anheftungsproteine (Adhäsionsproteine)

Fast alle Gewebe und Zellen kommunizieren mit Hilfe von Rezeptoren und Botenstoffen mit der ECM. Dies ist über bestimmte Anheftungs-, Adapter- oder Adhäsionsproteine möglich. Diese Proteine gehören zur extrazellulären Matrix und reagieren und interagieren mit den Zellrezeptoren. Am häufigsten und wichtigsten sind hierbei Laminine, Fibronectin und Vitronectin, die Integrine und andere.

1.1.2 Proteoglykane

Zu den Proteoglykanen werden z.B. Aggrecane, Perlecan und Decorin gezählt.

Sie bestehen aus Proteinen, die mit Glykosaminoglykanen (Polysacchariden) gekoppelt sind.

Hierbei spielen vier Hauptgruppen von Glykosaminoglykanen eine sehr wichtige Rolle.

Diese sind:

1. Hyaluronsäure
2. Chondroitinsulfat + Dermatan-sulfat
3. Heparansulfat + Heparin
4. Keratansulfat

Sie bilden leicht Gele aus und ziehen wegen ihrer negativen Ladung osmotisch aktive Kationen an, was eine Wasserverlagerung in die ECM zur Folge hat. Durch diesen Wassereinstrom wird ein Druck, der so genannte Quelldruck oder Turgor, bzw. Widerstand in der ECM aufgebaut, welcher äußeren mechanischen Einflüssen (z.B. Kompression) entgegenwirkt. Durch die Beschaffenheit der Glykosaminoglykane und deren wässriger Bestandteil sind Austausch und Passage (Diffusion) von Nährstoffen, Hormonen und anderen wichtigen Bestandteilen zwischen dem Blut und den Zellen möglich. Die Proteoglykane haben Einfluss auf die Fibrillogenese (Selbstassemblierung der Kollagene). Auch können sie verschiedene Proteine und Botenstoffe in der ECM binden und so Einfluss nehmen auf die verschiedensten Prozesse (z.B. Aufbau, Abbau, Umbau usw.) in der extrazellulären Matrix.

1.1.3 Proteasen der ECM

Die Proteolyse und die dazu gehörigen Proteasen in der ECM spielen bei vielen pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle (z.B. bei rheumatischer Arthritis, Parodontose und verschiedenen Hauterkrankungen)[2,3, 4]. Sie sind verantwortlich für Abbauprozesse der extrazellulären Matrix und Zelloberflächenproteine. Es werden 4 Gruppen von Proteasen unterschieden [4]:

1. Serin/Threoninproteinasen
2. Cysteinproteinasen
3. Aspartatproteinasen
4. Metalloproteinasen

Die Hauptgruppe und somit die wichtigste Gruppe der Proteasen der ECM sind die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).

Sie werden von Zellen gebildet und entweder in die ECM abgegeben oder in die Zellmembran eingebaut, dies ist aber noch nicht gesichert und Gegenstand weiterer Untersuchungen. Möglich ist auch, dass sie auch in der ECM gebildet werden können.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Rolle der MMPs und ihrer Inhibitoren, deshalb soll hier nur auf diese Proteasenfamilie ausführlich eingegangen werden.

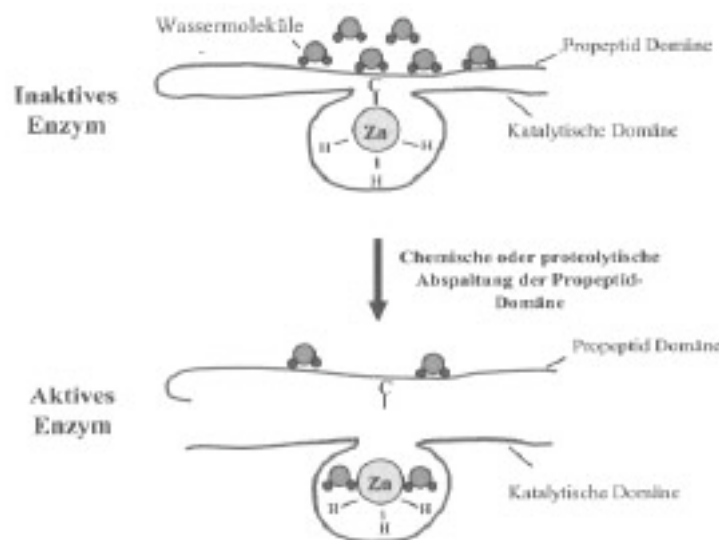
1.1.4 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind die bedeutendste Gruppe von Proteasen in der extrazellulären Matrix. Sie sind zinkhaltige Enzyme (Endopeptidasen) und kalziumabhängig.

1.1.4.1 Aktivierung („Cystein switch“)

MMPs gehören zu den Endopeptidasen und benötigen eine Aktivierung, können sich aber auch wahrscheinlich selbst aktivieren. Dies geschieht durch Abspaltung von Cystein und Anlagerung von Wassermolekülen an das Zinkatom. Siehe Abbildung 2 [6].

Abbildung 2 (Abb. 2) Mechanismus der Aktivierung der MMP



C = Cystein, H = Histidin, Zn = Zink (nach Sommerville et al., 2003)

In Abbildung 2 wird stark vereinfacht die Aktivierung der Proenzyme dargestellt. Das Proenzym wird durch die Bindung des Cystein an das Zinkatom stabilisiert und im inaktiven Stadium gehalten. Durch eine hydrolytische Abspaltung (cystein switch) der Propeptiddomäne mit ihrem Cystein wird die katalytische Domäne mit dem Zinkion aktiviert.

Dadurch bekommt das Enzym seine proteolytische Aktivität. Diese Aktivierung erfolgt durch eine autolytische Spaltung oder andere Proteasen (z.B. andere MMPs).

1.1.4.2 Einteilung der Matrix-Metalloproteasen

1962 wurde in einer *in vitro*-Studie von GROSS und NAGAI das erste Mal ein Enzym, welches Kollagenfibrillen angreift, gefunden. Dieses „kollagenolytische“ Enzym wurde später von GROSS und NAGAI [5] als Kollagenase (MMP1) identifiziert und beschrieben. Seit dieser Zeit wurden 27 weitere MMPs gefunden und charakterisiert. In Tabelle 2 werden die bereits bekannten humanen MMPs, ihre Namen und ihre Substrate aufgezählt. Diese Liste verändert sich aber ständig, da vieles auf diesem Gebiet noch unerforscht ist und immer neue Erkenntnisse dazukommen.

Tabelle 2 (Tab. 2) Bekannte humane Matrix-Metalloproteinasen

MMP	Name	Substrate
MMP-1	Interstitielle Kollagenase	Kollagene I, II, III, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrecan, MMP- 2, MMP- 9, proTNF, Myelinbaseproteine
MMP-2	Gelatinase A	Kollagene I, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Aggrecan, MMP- 2, MMP- 9, proTNF, Myelinbaseproteine, B Amyloid, Fibronectin, Elastin
MMP-3	Stromelysin	Kollagene I, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Aggrecan, MMP- 1, MMP- 7, MMP- 8, MMP- 9, MMP- 13, proTNF, Myelinbaseproteine, Perlecan, Fibronectin, Elastin, Laminin
MMP-4	Membrangebundene MMPs (MT-MMP)	
MMP-5	Membrangebundene MMPs (MT-MMP)	
MMP-6	Membrangebundene MMPs (MT-MMP)	
MMP-7	Matrilysin	Kollagene IV, X, Gelatine, Aggrecan, Fibronectin, Laminin, Elastin, proTNF, Myelinbaseproteine, MMP- 1, MMP- 2, MMP-9
MMP-8	Neutrophile Kollagenase	Kollagene I, II, III, V, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrecan, Fibronectin
MMP-9	Gelatinase B	Kollagene IV, V, VII, X, XIV, Gelatine, Aggrecan, proTNF, Myelinbaseproteine, Fibronectin, Elastin, Versican, Nidogen, α -1-Proteinase- Inhibitor, Proteoglykan-Link-Protein

MMP-10	Stromelysin 2	Kollagene III, IV, V, Gelatine, Aggrekan, Elastin, Fibronektin, MMP- 1, MMP- 8
MMP-11	Stromelysin 3	α -1-Proteinase- Inhibitor
MMP-12	Metalloelastase	Kollagene IV, Gelatine, Elastin, Fibronektin, Laminin, proTNF, Myelinbaseproteine
MMP-13	Kollagenase 3	Kollagene I, II, III, IV, Gelatine, Aggrekan
MMP-14	MT1-MMP	Kollagene I, II, III, Gelatine, Elastin, Fibronektin, Aggrekan, proTNF, MMP- 2, MMP- 13
MMP-15	MT2-MMP	MMP- 2, Gelatine, Fibronektin, Laminin
MMP-16	MT3-MMP	MMP- 2
MMP-17	MT4-MMP	ProTNF, Fibrinogen, Fibrin
MMP-19	RASI- 1	Aggrekan, Cartilage oligometric matrix Protein (COMP)
MMP-20	Enamelysin	Aggrekan, Cartilage oligometric matrix Protein (COMP)
MMP-23	CA- MMP	
MMP-24	MT5-MMP	ProMMP- 2
MMP-25	MT6-MMP	
MMP-26	Endometase	
MMP-27		
MMP-28	Epilysin	

Man hat die MMPs früher wegen ihrer Substratspezifität unterschieden und teilte sie in Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen, Membran-gebundene-MMPs (MT-MMPs) und Matrilysine ein. Eine neuere Einteilung unterteilt sie in 8 verschiedene Klassen anhand ihrer Struktur. Die ersten 5 Klassen (I-V) bestehen aus in die ECM sezernierten MMPs, während die anderen drei Klassen (VI- VIII) membrangebundene MMPs sind. Siehe hierzu Abbildung 3 (Abb.3) [6,7].

Die 5 Klassen der in den Extrazellulärraum sezernierten MMPs sind:

1. MMPs mit einer Hämapexin-Domäne (z.B.: MMP- 1, - 3, - 10, - 13)
2. Gelatine-bindende MMPs (MMP- 2, MMP- 9)
3. MMPs mit minimaler Domäne (MMP- 7, MMP- 26)
4. Furin-aktivierte und sezernierte MMPs (MMP- 11, MMP- 28)
5. MMPs mit Vitronektin-ähnlichen Einschüben

Die 3 Klassen der Membran-gebundenen MMPs sind:

1. Typ-I-transmembrane MMPs (MMP- 14, - 15, - 16, - 24)
2. Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) verankerte MMPs (MMP- 17, MMP- 25)
3. Typ-II-transmembrane MMPs (MMP- 23)

1.1.4.3 Struktur der MMPs

Die Grundstruktur einer Matrix-Metalloproteinase besteht aus (siehe Abb.3):

1. Signalpeptid:

Dieses ist für die Sekretion der intrazellulär gebildeten MMPs in das endoplasmatische Retikulum der Zelle verantwortlich. Alle MMPs haben ein Signalpeptid, außer MMP- 17. Es besteht aus ca. 20 hydrophoben Aminosäuren.

2. Propeptid:

Es beinhaltet Cystein und damit die in diesem enthaltene Thiol-Gruppe (SH), welche mit dem Zink-Ion der katalytischen Domäne interagiert und so dessen Aktivierung verhindert. Siehe Abb.2 [8]. Es können auch Vitronectin-ähnliche Einschübe oder am C-terminalen Ende Furin-Spaltungsstellen vorhanden sein.

3. Katalytische Domäne:

In ihr befindet sich das für MMPs so typische und wichtige Zinkatom. Dieses ist für viele entscheidende Eigenschaften und Prozesse der MMPs bedeutend (z.B. die Aktivierung oder Deaktivierung der Proteasenwirkung, siehe Abb.2), und es interagiert mit Bestandteilen anderer Domänen. Außerdem kann die

katalytische Domäne zusätzlich Fibronectin Typ-II-Einschübe enthalten.

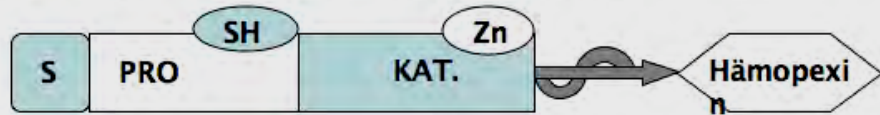
Bei den einzelnen MMPs befinden sich im Anschluss an den katalytischen Teil verschiedene andere Domänen. Diese variieren nach der Klasse und Struktur des jeweiligen MMPs. Es können folgende Domänen sein:

4. ggf. die Hinge-Region
5. ggf. eine Hämoxygenase-ähnliche Domäne
6. ggf. eine transmembranöse- und cytoplasmatische Domäne
7. Immunglobulin-Domäne
8. GPI-anker, Signalanker, „cysteine arrays“ oder TypV Kollagen-ähnliche Einschübe

Abbildung 3 (Abb.3) Modifizierter schematischer Aufbau der Matrix-Metalloproteinasen

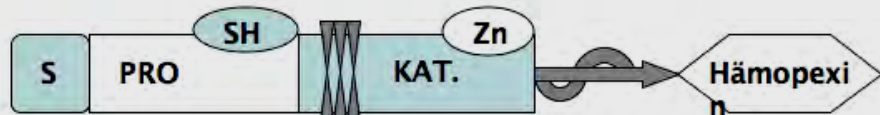
Gruppe I-V: in die ECM sezernierte Matrix-Metalloproteinasen

Gruppe I
MMPs mit einfacher
Hämopepin-Domäne;
z.B. MMP-1, -3, -10,
-13

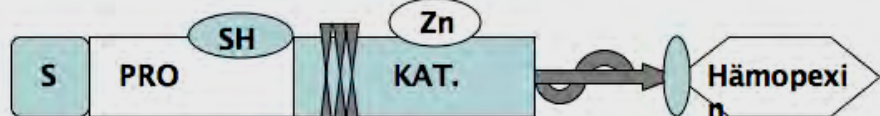


Gruppe II
Gelatine-bindende
MMPs;
z.B. MMP-2, -9

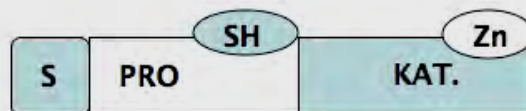
MMP-2



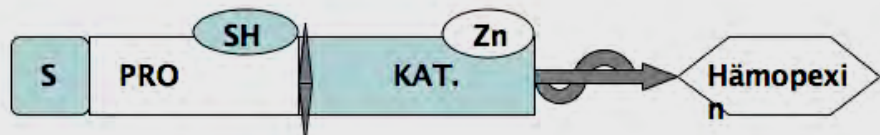
MMP-9



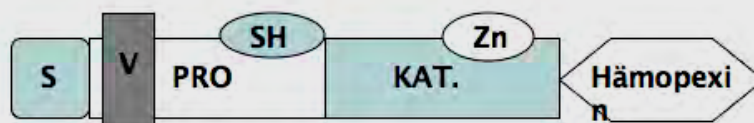
Gruppe III
MMPs mit minimaler
Domäne;
z.B. MMP-7 und MMP-26



Gruppe IV
Furin-aktivierte und
sezernierte MMPs;
z.B. MMP-11, -28

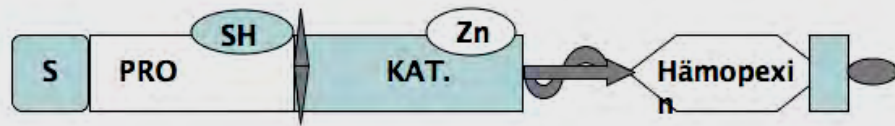


Gruppe V
MMPs mit
Vitronektin-
ähnlichen
Einschüben

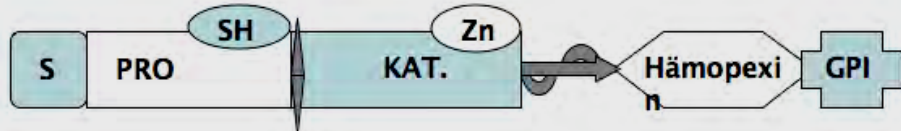


Gruppe VI-VIII: Membran-gebundene MMPs

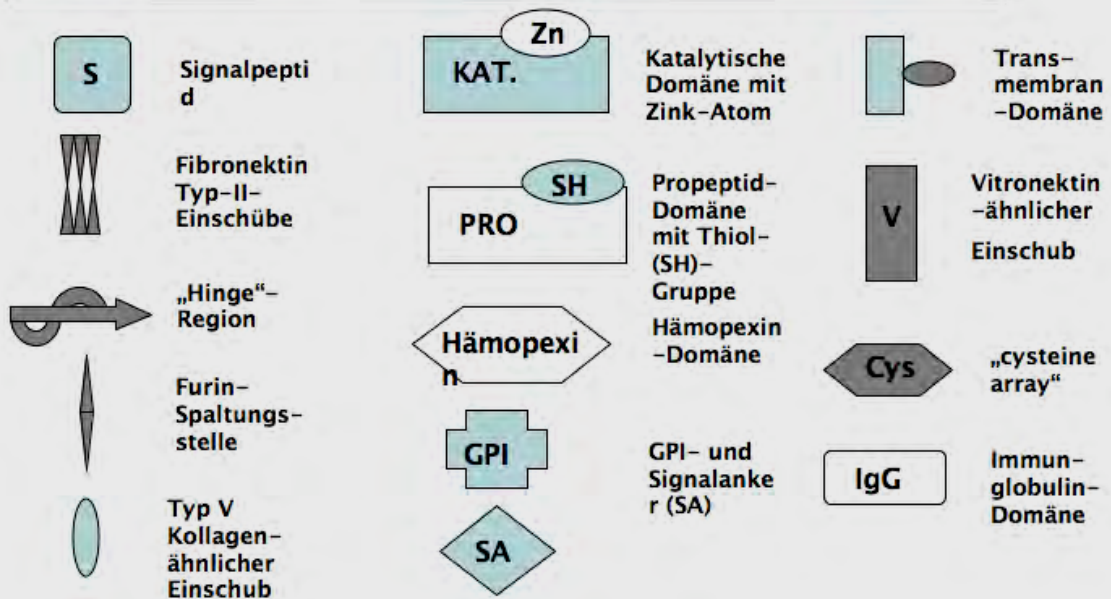
Gruppe VI
Typ-I-
transmembrane
MMPs;
z.B. MMP-14, -15,
-16, -24



Gruppe VII
GPI-verankerte
MMPs;
z.B. MMP-23



Gruppe VIII
Typ-II-
transmembrane
MMPs;
z.B. MMP-17, -25



1.1.4.4 Aufgaben der Matrix-Metalloproteinasen

Die MMPs sind am Umbau der ECM maßgeblich beteiligt. Sie spielen bei der Wundheilung, Narbenbildung, bei Umbauprozessen, bei verschiedenen Krankheiten wie rheumatischer Arthritis, Parodontose, Hauterkrankungen und deren Gewebeveränderungen eine wichtige Rolle [2, 4, 9, 10, 17]. Auch in der Tumorinvasion und Metastasierung sind sie von großer Bedeutung. So findet man erhöhte MMP-Expressionsspiegel in invasiven malignen Tumoren [9,10]. Auch scheint ein Zusammenhang zwischen MMPs und Tumorangiogenese und Tumorzellinvasion zu bestehen .

Bei der Narbenbildung und Wundheilung (Remodelling) am Herzen nach oder bei bestimmten Herzkrankheiten (Myokarditis, Z.n. Herzinfarkt, usw.) wird den MMPs eine entscheidende und ausschlaggebende Rolle zugeschrieben. Siehe dazu später das Kapitel: Ziele der Arbeit und die Diskussion. Um einen Überblick zu gewinnen, werden hier ein paar exemplarische Krankheiten und Veränderungen aufgezeigt und erklärt.

1. MMPs bei Hauterkrankungen
2. MMPs bei Wundheilung, Umbauprozessen und Narbenheilung
3. MMPs bei Tumorinvasion, Metastasierung und Tumorangiogenese
4. MMPs bei Herzerkrankungen

1.1.4.5 Regulierung der MMP-Expression (Signalinduktionsweg)

Die Expression der MMPs unterliegt einer Reihe von Regulationsmechanismen. Die Hoch- oder Herunterregulierung der MMPs erfolgt entweder:

- bei der Transkription: durch Einwirken von Zytokinen und vielen Wachstumsfaktoren oder
- Posttranskriptionell: durch Stabilisierung der mRNA verschiedener MMPs, gezielte Freisetzung intrazellulär gespeicherter MMPs [7] oder Beeinflussung durch spezielle Rezeptoren an der Basalmembran (z.B. Reck-Rezeptor)

Viele Regulationsmechanismen sind dabei aber noch nicht bekannt und Gegenstand weiterer Untersuchungen.

1.1.5 Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen

1.1.5.1 Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs)

Die TIMPs sind spezifische Inhibitoren der MMPs. Sie sind somit für die Regulation der MMPs und die Umstrukturierungen in der ECM enorm wichtig. Für den Ab- oder Aufbau des Bindegewebes ist das Zusammenspiel von MMPs und TIMPs entscheidend [20]. Im normalen Gewebe besteht ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der ECM, also auch ein Gleichgewicht von MMPs und deren spezifischen Inhibitoren. Bei pathologischen Veränderungen wird dieses Gleichgewicht verschoben. So kann z.B. durch hohe TIMP-Konzentrationen der Matrixabbau vermindert oder aufgehoben werden.

Die Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases gehören zur Gruppe der Kollagenaseninhibitoren. Bis heute wurden vier unterschiedliche TIMPs identifiziert. Es gibt TIMP-1, -2, -3 und -4. Sie besitzen in ihrer Struktur teilweise große Gemeinsamkeiten, aber auch ihre typischen und charakteristischen strukturellen Eigenheiten. Die verschiedenen TIMPs binden zu den unterschiedlichen Matrix-Metalloproteinasen mit speziellen Affinitäten [11]. So besitzen TIMP-1 und TIMP-2 eine bestimmte Affinität zu MMP-9 und TIMP-3 zu MMP-2. Sie wirken aber auch bei den verschiedensten anderen MMPs in verschiedenen Ausprägungen (z.B. wirkt TIMP-1 auch auf MMP-3 und Progelatinase B). Die TIMPs gehen mit den aktivierten MMPs eine 1:1-Bindung ein und setzen so ihre proteolytische Aktivität herab, verhindern diese aber nicht vollkommen. Dies wird durch die kristallartige Struktur des TIMP-MMP-Komplexes hervorgerufen. Die TIMPs binden mit ihrem N-terminalen Ende über Disulfidbrücken an die aktivierte Seite der entsprechenden MMPs. Dadurch werden 75% der katalytischen Domäne besetzt und das Zinkatom beeinflusst. Durch diese Blockierung wird die enzymatische Aktivität gemindert.

Die TIMPs sind Glykoproteine mit konservierten Cysteinresten, wodurch die so genannte „sechs-Peptidschleifenstruktur“ entsteht. Aufgrund dieser Struktur scheinen sie besondere Widerstandskräfte gegen extreme Temperatur- und pH-Wert-Veränderungen zu haben. Sie besitzen einen N-terminalen Bereich, C-terminalen Abschnitt und einen reaktiven Mittelbereich (reactive ridge)[12]. Siehe stellvertretend für alle TIMPs struktureller Aufbau von TIMP-1 und TIMP-2 in Abbildung 4 (Abb.4).

Die TIMPs unterscheiden sich durch die verschiedenen eingebauten Aminosäuren, wie z.B. Ile35, Tyr36, Asn38, Ala, Gly und Thr98 oder Aminosäuresequenzen, wie z.B. Cys1-Thr-Cys-Val4, Glu67-Ser-Val-Cys70. Der Hauptunterschied zwischen TIMP-1 und TIMP-2 ist, dass TIMP-2 eine längere AB-Schleife besitzt. Eine Carbamylation der N-terminalen Aminogruppe,

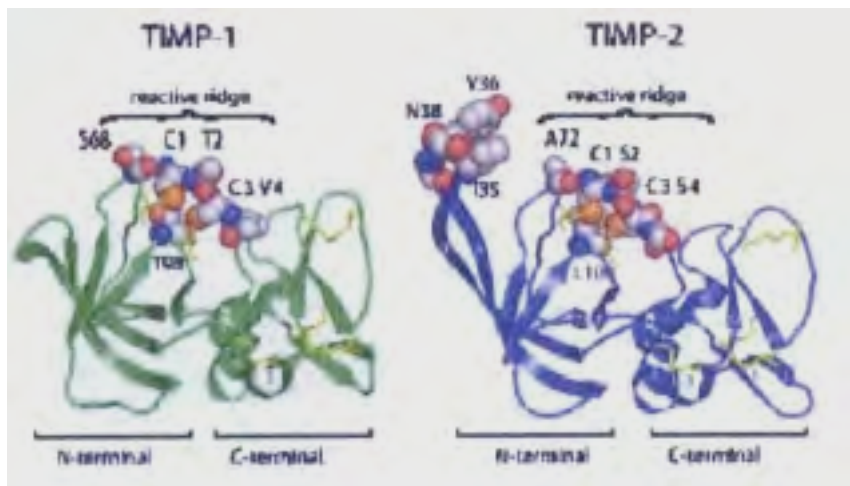
Mutationen im Aufbau des TIMP oder das Einfügen eines zusätzlichen Ala am N-terminalen Ende können zu einer teilweisen oder vollständigen Inaktivierung des TIMP führen.

Die TIMPs werden von den unterschiedlichsten Zellen (z.B. Fibroblasten, Makrophagen, Monozyten, Ito-zellen usw.) synthetisiert [14]. Diese Synthese kann durch Mediatoren (z.B. IL-6 Typ-Zytokine) oder andere verschiedene Stimuli (z.B. Transforming growth factor beta (TGFβ)) hochreguliert werden. Andere Substanzen (z.B. Dexamethason und Concanavalin) oder Einflüsse können zu einer Suppression der TIMP-Synthese und -Ausschüttung führen.

Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases hemmen nicht nur die enzymatische Aktivität der MMPs und damit den Abbau der ECM, sondern können auch Einfluss nehmen auf das biologische Verhalten der betroffenen Zellen. So kann es zu vermehrtem Zellwachstum, Morphologieveränderungen und Vermeidung von Zelltod (Apoptose) bei bestimmten Zellen kommen [13, 14, 15].

Aber nicht nur eine überschießende MMP-Expression, sondern auch eine Überproduktion von TIMPs kann zu pathologischen Veränderungen führen. So können z.B. hohe TIMP-1-Spiegel eine Fibrosebildung in verschiedenen Geweben (Lunge, Nieren usw.) unterstützen.

Abbildung 4 (Abb. 4) Struktureller Aufbau von TIMP-1 und TIMP-2



Die Cys1-, Thr2-, Cys3-, Val4-, Ser68- und Thr98-Reste sind als Kugel dargestellt. Disulfidbrücken sind gelb gefärbt. Grün und blau sind die jeweiligen Peptidschleifen des jeweiligen TIMP abgebildet. (Zeichnung nach Nagase, Visse, Murphy 2006)

1.1.5.2 Andere Inhibitoren der MMPs

Neben den TIMP wurden auch einige synthetische MMP-Blocker entwickelt oder entdeckt, z.B. Tetracycline [16]. Sie chelatisieren das katalytische Zinkatom durch Thiol-, Carboxyl-, Phosphat-, Sulfodimin- oder Hydroxamatgruppen und inaktivieren es dadurch. Diese Blocker müssen sehr vorsichtig und selektiv eingesetzt werden, um ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erreichen. Viele dieser Substanzen sind im Moment Gegenstand von Studien und benötigen weitere Abklärung.

1.1.6 Vorstellung und kurze Einführung in die spezielle Krankheitslehre des Herzens

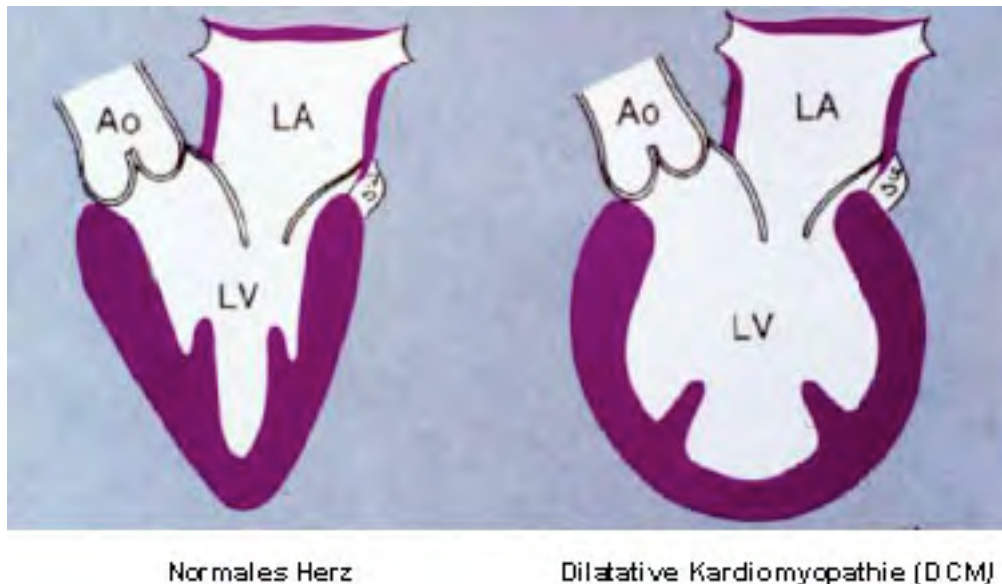
1.1.6.1 Dilatative Kardiomyopathie (Dilated Cardiomyopathy, DCM)

Die dilatative Kardiomyopathie ist eine schwere Erkrankung des Herzens, deren Ursache in der Mehrzahl der Fälle unbekannt ist, weshalb sie auch als primäre Kardiomyopathie bezeichnet wird. Sie ist charakterisiert durch eine Ventrikeldilatation, die zur Ausbildung einer vergrößerten, runden Herzsilhouette führt. Die Behandlung kann nur symptomatisch erfolgen, und diastolische und systolische Funktionsstörungen resultieren in einer ausgeprägten Herzinsuffizienz, welche schließlich zum Tode führt. Bei einem kleineren Teil der Kardiomyopathien ist die auslösende Ursache bekannt, wie z.B. Infektionen, toxische Noxen und immunologische Prozesse bei genetischer Vorbelastung. Die Unterscheidung und Übergänge in sekundäre Kardiomyopathien sind unscharf und fließend. Als typische Symptome gelten: langsam fortschreitende Herzinsuffizienz mit Hypoperfusion der Extremitäten, Zyanose, Herzversagen, Angina Pectoris, Herzrhythmusstörungen, Schwindel, Synkopen, arterielle Embolien, plötzlicher Herztod usw. Diese Symptome können einzeln oder in den verschiedensten Zusammensetzungen auftreten.

Die DCM ist die häufigste primäre Kardiomyopathie mit steigender Tendenz. Es sind häufiger Männer nach dem 40sten Lebensjahr betroffen, und es werden familiäre Häufungen beobachtet.

Viele Patienten sterben an dieser Erkrankung oder an deren Komplikationen. In einigen Fällen ist eine Herztransplantation die einzige Möglichkeit, das Leben des Patienten zu retten [18, 46].

Abbildung 5 (Abb. 5) Schematische Darstellung vom normalen Herzen im Vergleich zum Herzen bei Dilatativer Kardiomyopathie



1.1.6.2 Koronare Herzerkrankung (Ischemic cardiomyopathy, Ischämische Herzerkrankung, KHK, ICM)

Klinische Symptome treten erst auf, wenn der Sauerstoffverbrauch des Herzgewebes nicht mehr gedeckt werden kann und es zu einer Unterversorgung dieses Gewebes kommt. Dieses Missverhältnis von Sauerstoffverbrauch und Angebot hat viele mögliche Ursachen [18, 46].

Man unterscheidet hierbei:

1. Gründe, welche zu Verminderung des Sauerstoffangebotes führen:

Primäre Ursachen:

- Der Hauptgrund ist die Verengung des Lumens der Koronararterien durch Atherosklerose (99% aller Fälle)
- Entzündungen der Koronararterien (Vaskulitiden)

Sekundäre Gründe:

- Thrombosen, Koronarspasmen, Embolien, Koronardissektionen
- Verengungen des Gefäßlumens durch äußere Einflüsse (z.B. Tumore, Kompression)
- Verminderter Perfusionsdruck (bei Schock oder Rechtsherzinsuffizienz)

- Blutviskositätszunahme (Leukämie, Plasmozytom und Polyglobulie)
- Verkürzte Diastole
- Respiratorische Insuffizienz
- Blutarmut
- Sauerstoffverdrängende Vergiftungen (Kohlenmonoxid)

2. Ursachen für eine Erhöhung des myokardialen Sauerstoffbedarfs:

- Erhöhte Muskulararbeit am Herzen (z.B. bei Hypertrophie des Herzmuskelgewebes, körperliche Anstrengung, hypertone Entgleisung (Anstieg der Nachlast), Infektion, Fieber oder Hyperthyreose)
- Erhöhung der Herzwandspannung (bei z.n. Herzinfarkt, DCM, Anpassungsreaktion des Gewebes auf chronische Druck- und Volumenbelastung, z.B. bei Herzfehlern)

Das Leitsymptom der KHK ist die Angina pectoris, d.h. ein meist dumpfer, drückender, einschnürender oder seltener brennender Brustschmerz hinter dem Sternum. Man unterscheidet die stabile und instabile Form der Angina pectoris in verschiedenen Ausprägungstypen.

Weitere klinische Manifestierungen der KHK sind Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, stumme Ischämie, Herzrhythmusstörungen oder der plötzliche Herztod.

Als Risikofaktoren gelten hohes Cholesterin im Blut, Rauchen, Übergewicht, Bewegungsmangel, Hypertonie, Diabetes mellitus, genetische Prädisposition, Geschlecht, Alter und Stress.

1.1.6.3 Myokarditis (Myocarditis, MYO)

Die Myokarditis ist ein entzündlicher Prozess des Herzmuskelgewebes, welcher bei oder nach Virus- (Parvovirus B19, Coxsackie A und B, Influenza A und B, Herpes-, Echo-, Polio-, Hepatitisviren oder HIV) und bakteriellen Infektionen (z.B. Pneumokokken-, Meningokokken-, Streptokokken-, Staphylokokkeninfektionen), toxischen Reaktionen (z.B. Diphtherie- oder Scharlach-Toxine), allergischen Prozessen (nach verschiedenen Medikamentengaben, z.B. nach Sulfonamide oder Pyrazolonderivaten), idiopathischen Geschehnissen (Riesenzellmyokarditis), operativen Eingriffen und systemischen Erkrankungen (z.B. Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis, Dermatomyositis) auftreten kann. Die häufigste Ursache ist in der westlichen Welt eine Infektion mit Coxsackie-B-Viren. Meist ist der Verlauf einer Myokarditis klinisch unauffällig. Als mögliche klinische Symptome gelten allgemeine Beschwerden (Müdigkeit, Schwäche), Herzrhythmusstörungen (Herzrasen, Herzstolpern), Luftnot, Myalgien, Palpitationen und Hypotonie.

In schweren Fällen kann es zu einer Herzdilatation oder einer Herzinsuffizienz kommen [18, 46].

1.1.7 Ziel der Arbeit

In zahlreichen Studien wurden in den letzten 15 Jahren die MMPs, TIMPs und Kollagene untersucht und ihre Rolle bei der Entstehung der Fibrose im Allgemeinen und am erkrankten Herzen im Besonderen erforscht. Inzwischen sind durch diese intensiven Bemühungen, sei es im Tierexperiment oder am menschlichen Herzen, die wichtigsten Eigenschaften, Typen, Aufgaben und das Zusammenspiel all dieser Komponenten bekannt.

Die Veränderungen der ECM bestimmen ganz wesentlich den Verlauf einer myokardialen Erkrankung, da durch Zunahme der Fibrose die Steifigkeit der Ventrikel erhöht und damit die Compliance herabgesetzt wird. Es gibt in der Literatur einige Berichte über die Veränderungen der ECM im erkrankten Herzen, jedoch fehlen eine zusammenfassende Übersicht und der Vergleich der Veränderungen bei den verschiedenen Pathogenesen am Herzen. Deshalb sollte in dieser Arbeit eine vergleichende Studie durchgeführt werden. Des Weiteren sollte ein Vergleich zwischen den Veränderungen der verschiedenen Komponenten der ECM-Synthese und ECM-Degradation durchgeführt werden.

Wir gingen in der vorliegenden Arbeit von der Hypothese aus, dass die Wechselwirkung und das Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau der verschiedenen Kollagene und anderer Bestandteile der ECM, wie z.B. Fibronectin, entscheidend für die Entstehung der Fibrose und damit die Funktionsstörung des Herzens sind. Diese Hypothese konnte an menschlichen Herzen mit unterschiedlicher Erkrankung getestet und bestätigt werden. Es soll deshalb hier im Detail über die Resultate berichtet und diese ausführlich anhand der Literatur diskutiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Gewebe, Patientengruppen, Gewebeherkunft und Aufbewahrung

2.1.1 Patientengruppen

In dieser Studie wurden 5 verschiedene Gruppen untersucht.

Dies waren folgende:

- Myokarditis (Myocarditis, MYO)
- Idiopathische dilatative Kardiomyopathie (Dilated Cardiomyopathy, DCM)
- Koronare Herzerkrankung (Ischemic cardiomyopathy, ICM)
 - Remote - Zone (ICM – RZ)
 - Border - Zone (ICM – BZ)
- Kontrollpatienten (Kontrolle)

Tabelle 3 (Tab. 3) Patientendaten und Gruppeneinteilung in der Übersicht

Gruppe:	Anzahl:	Alter:	Geschlecht: Mann/Frau	EF (%):	NYHA:
MYO	6	43.4 ± 5.8	4/2	23 ± 4.3	IV (6/6)
DCM	6	49.3 ± 6.7	6/0	15 ± 2.1	IV (6/6)
ICM	7	54.8 ± 2.4	7/0	21 ± 2.2	IV (7/7)
Kontrolle	8	51.5 ± 5.8	6/2	> 60%	----

2.1.2 Gewebe

Für diese Studie wurde ausschließlich mit menschlichem Herzmuskelgewebe gearbeitet. Dieses Gewebe waren Präparate aus dem: 1.linken Atrium, 2. rechten Atrium, 3. linken Ventrikel, 4.rechten Ventrikel, sowie 5. Septum.

Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung (Remote-Zone, RZ) wurde zusätzlich eine Gruppe, die sog. „Border-Zone“ (BZ) verwendet. Das „Border-Zone“-Gewebe wurde aus Regionen des Herzmuskels gewonnen, welche direkt an die Infarktnarbenregion angrenzen. Dieses Vorgehen ermöglicht einen direkten Vergleich von Remote- und „Border-Zone“- (angrenzenden) Myozyten in dieser Studie.

Dieses Gewebe stammt ausschließlich von Patienten mit schwersten Herzerkrankungen im Endstadium, welche transplantationsbedürftig waren. Diese Patienten waren im sogenannten „end-stage heart failure“ (EF < 20%). Alle diese Patienten waren nach der New York Heart Association-Einteilung (NYHA) Grad IV.

2.1.3 Gewinnung und Aufbewahrung

Patientengewebe:

Diese Proben wurden uns großzügigerweise von der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden während Transplantationen, Operationen oder aus nicht transplantationsfähigen Herzen gewonnen. Sie wurden bei den jeweiligen Operationen entnommen und sofort danach in Proben von 5 - 10 mm Größe zerteilt und mit flüssigem Stickstoff bei -180°C tiefgefroren. Nach dieser Prozedur wurden die Gewebeproben in speziellen Kühlschränken bei -80°C gelagert bis zur Weiterverarbeitung. Die zuständige Ethikkommission gab ihr Einverständnis zu dieser Studie.

Kontrollgruppe:

Als Kontrollgewebe diente Herzmuskelgewebe, das nicht pathologisch verändert war. Es stammte von Unfallopfern, deren Herzen nicht als Spenderorgane verwendet werden konnten oder von Operationen, bei denen es notwendig war, auch ein Stück gesundes Gewebe zu entfernen (z.B. Mitralstenosenoperationen)

2.2 Herstellung und Färbung der Präparate

In den nachfolgenden Teilen werden die verschiedenen verwendeten Färbetechniken beschrieben und erläutert.

2.2.1 Hämatoxin-Eosin-Präparate (HE-Färbungen)

Die HE-Färbungen waren notwendig, da durch sie eine gute Strukturbestimmung und Überprüfung des Gewebes möglich ist. Die HE-Färbung ist hierfür besonders gut geeignet, da hierdurch die Strukturen besonders gut dargestellt werden und gegebenenfalls Schnitt- oder Gefrierschäden frühzeitig entdeckt werden können. Außerdem ist die HE-Färbung leicht und schnell durchzuführen. Dadurch konnten Verluste von Präparaten/Schnitten durch vorgeschaltete Überprüfung minimiert werden. Das Protokoll zur HE-Färbung siehe Tabelle 4 (Tab.4). Nach der Färbung wurden nun die HE-Präparate mit einem Lichtmikroskop untersucht, begutachtet, eingeschätzt und gegebenenfalls ausgesondert.

Tabelle 4 (Tab. 4) Protokoll zur Durchführung der HE-Färbung

Schritt	Durchführung/Vorgehensweise	Dauer
1.	Schnitt mit Hämatoxinlösung benetzen	10 Minuten
2.	Mit viel Wasser gründlich spülen und dabei das Präparat nicht beschädigen	Bis Wasser fast klar
3.	Mit Aqua dest. gut spülen	Mehrmaliges Waschen/Eintauchen
4.	Danach mit Eosin überschichten	6 Minuten
5.	In 95 %igem Alkohol waschen	1-2 mal
6.	In 100 %igem Alkohol waschen (1. Bad)	Bis Objektträger/Präparat klar ist
7.	In 100 %igem Alkohol waschen (2. Bad)	Bis Objektträger/Präparat klar ist
8.	In Xylol baden	5 Minuten
9.	Eindeckeln in Entellan	

2.2.2 Immunhistologisches Anfärben und Präparatherstellung

- **Schneiden und Fixieren**

Die Gewebeproben wurden mit Tissue Tek-Einbettungsmedium auf Metallhaltern fixiert und beschriftet. Danach wurden mit Hilfe eines Kryotoms (Leica Kryostat CM 3050 S, der Firma Leica Microsystems GmbH) 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden dann auf einen mit Silikon (siehe Anhang Rezept 1) beschichteten Objektträger (Marke Menzel – Super Frost) aufgebracht.

Objekttemperatur: -23°C; *Kühltemperatur:* - 25°C

Im Anschluss wurden die Schnitte für 10 Minuten in Aceton gelegt bei -20°C. Eine weitere Fixierungsmethode war das 10 Minuten lange Behandeln des Präparats mit 4 % Paraformaldehyd oder mit Carnoy's Lösung (siehe Anhang Rezept 2) bei Raumtemperatur. Bei der Aceton- und Carnoyfixierung wurden die Schnitte danach luftgetrocknet und anschließend mit Phosphate Buffered Saline (PBS; Rezept siehe Rezept 3 im Anhang) gründlich gewaschen. Bei der Paraformaldehydfixierung wurde direkt mit PBS gewaschen.

Danach wurden alle Präparate in einer 1% Bovine Serum-Albumin-Lösung für 30 Minuten inkubiert, um die nicht-spezifischen Bindungsstellen zu blockieren.

Es folgte eine ausgiebige Waschung der Objektträger mit PBS. Die verschiedenen Fixierungsmethoden waren nötig, um eine optimale Anfärbung durch die immunhistologischen Marker zu ermöglichen, da die Stärke der Affinität des Antikörpers zur speziellen Bindungsstelle bei den Fixierungsmethoden variiert.

- **Färbungen**

Nach dieser aufwändigen Vorbehandlung konnte nun mit der immunhistologischen Färbung spezieller und spezifischer Strukturen begonnen werden. Zuerst wird nun der 1. Antikörper in der entsprechenden Konzentration mit Hilfe einer Pipette aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlraum inkubiert. Nach mehrmaligem ausgiebigem Waschen mit PBS am nächsten Tag wird nun der passende 2. Antikörper im richtigen Mischungsverhältnis aufgetragen und zum Einwirken des Antikörpers eine bestimmte Zeit wieder in eine feuchte Kammer bei Raumtemperatur gelegt. Es folgte danach Waschen in PBS. Bei dem 3. Antikörper wurde in gleicher Weise verfahren. Ausgiebiges Waschen mit PBS ist bei allen Schritten sehr wichtig, um die überschüssige Antikörperlösung von den Schnitten zu entfernen und dadurch Überlagerungen oder Fehlfärbungen zu verhindern. Wichtig ist auch, bei diesen Färbungen für jeden

Antikörper eine eigene separate Feuchtkammer zu benutzen, da es sonst zu Überlappungen kommen kann. Das genaue Vorgehen wird in den folgenden zwei Abschnitten und Tabelle 3 erklärt.

Das Schema für Doppelfärbungen wird im Kapitel 2.2.2.3 und Tabelle 6 ausgiebig behandelt.

- **Eindeckeln/Verschließen**

Nach dem Färbevorgang wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit Deckgläsern der Firma Marienfeld und Mowiol (siehe Anhang Rezept 4) als Einschlußmedium verschlossen.

2.2.2.1 Testfärbungen und Standardisierungen der Färbetechnik

Es wurden Testfärbungen durchgeführt, um die Wirksamkeit und Eigenschaften der

1. Antikörper zu spezifizieren und die besten Konzentrationen und Standardverfahren für die Färbungen von MMP2, MMP8, MMP 19, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4, Smooth muscle α -actin, Vimentin, CD3, CD68, ICTP, PINP und PIINP zu finden. Auch wurde die direkte und die indirekte Methode für den 2. Antikörper (2. AK) und den 3. Antikörper (3. AK) getestet. Die Testfärbungen wurden nach dem Schema, wie in Tab. 5 dargestellt durchgeführt und auch für die weiteren Färbungen in diesem standardisierten Protokoll verwendet. Dazu zählen auch die Doppel-Fluoreszenz-Antikörperfärbungen, siehe hierzu Tabelle 6.

2.2.2.2 Färbungsschemata Einzelfärbungen

In der folgenden Tabelle werden nun die standardisierten Färbungsschemata vorgestellt.

Die Färbungen mussten unbedingt unter exakt gleichen Bedingungen durchgeführt werden, um später die Ergebnisse vergleichen zu können. Um dies zu gewährleisten und die gleichen Bedingungen während der Herstellung der Färbungen zu sichern, wurden alle immunhistologischen Färbungen zeitgleich durchgeführt. So konnten wir gewährleisten, dass alle Präparate unter den gleichen standardisierten Bedingungen angefertigt wurden.

Es wurden immer Schnitte von 5 μ m des entsprechenden Gewebes für die Färbungen verwendet. Genaues Färbungsprotokoll siehe Tabelle 5.

Tabelle 5 (Tab. 5) Färbeverfahren für die Schnitte/Präparate

Schritt	Durchführung/Vorgehensweise	Dauer
1.	<p>Fixierung und Vorbereitung:</p> <p>a) Aceton (-20°C) (zuerst 10 Minuten Lufttrocknung bei Raumtemperatur)</p> <p>b) 4% Paraformaldehyd (Raumtemperatur)</p> <p>c) Carnoy's Lösung (Raumtemperatur)</p> <p>Welche Fixierung ist abhängig vom verwendeten Antikörper</p>	10 Minuten
2.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
3.	Inkubation und Blockung der nicht-spezifischen Bindungsstellen mit Bovine Serum Albumin (BSA)	10 Minuten
4.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
5.	<p>Nach Trocknen Auftragen des 1. Antikörpers (1. AK) in den verschiedenen Konzentrationen</p> <p>Je Schnitt 30 µl der Lösung auf dem Präparat verteilen</p>	Über Nacht (8-12 Stunden)
6.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
7.	<p>Nach gründlichem Trocknen kann der 2. Antikörper (2. AK) in der jeweiligen Verdünnung aufgetragen werden;</p> <p>Je Schnitt 30 µl der Lösung auf dem Präparat verteilen</p> <p>a) Direkte Methode (2. AK und 3. AK direkt miteinander gekoppelt)</p> <p>b) Indirekte Methode (nur 2. AK)</p>	1 – 2 Stunden
8.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten

9. Nur bei 7 b)	Nach gründlichem Trocknen kann der 3. Antikörper (3. AK) in der jeweiligen Verdünnung aufgetragen werden; Je Schnitt 30 µl der Lösung auf dem Präparat verteilen	a) ICTP, PINP und PIINP: 45 Minuten b) bei allen anderen: 30 Minuten
10.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
11.	Im Anschluss daran wird der Kern mit 4',6-Diamidino-2'-phenylindol - Dihydrochlorid (DAPI) angefärbt	Ca. 30 Minuten
12.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
13.	Nach Trocknung Verschließen und Eindeckeln mit Mowiol	

Beim gründlichen Trocknen muss vermieden werden, den Schnitt austrocknen zu lassen, vielmehr sollte hierbei das überflüssige PBS vom Präparat entfernt werden, um nicht Auswirkungen durch Verdünnungen durch PBS auf den Färbungsvorgang zu bekommen.

Bei allen diesen Färbungsvorgängen wurde immer eine Negativkontrolle angefertigt. Negativkontrolle bedeutet, dass an einem Schnitt der 1. AK durch PBS-Lösung ersetzt wurde. Alle anderen Schritte wurden identisch mit den anderen Schnitten mit 1. AK durchgeführt. Diese Negativkontrolle ermöglichte uns die Kontrolle, ob die immunhistologische Färbung wirklich spezifisch ist.

Außerdem ist hier noch einmal auf den Gebrauch von verschiedenen Feuchtkammern für jeden Antikörper beim Markieren durch den 1. AK zu achten. Dadurch werden Fehlfärbungen und Falschfärbungen vermieden, da es zu Antikörper-Kreuzreaktionen kommen kann und die Spezifität nicht mehr gewährleistet wäre.

2.2.2.3 Doppel – Färbungen

Da sich die Doppel – Färbungen in ein paar Dingen von der Einzelfärbung unterscheiden, wird in diesem Abschnitt diese Färbemethode und das dabei angewandte Färbungsprotokoll erläutert (siehe Tab.6). Der grundsätzliche Unterschied der Doppel- zur Einzelfärbung ist, dass bei der Doppelfärbung zwei 1.Antikörper verwendet werden und so zwei oder mehrere spezifische Strukturen mit unterschiedlichen Farben in einem Präparat dargestellt werden.

Die 1. Antikörper müssen von verschiedenen Spezies sein, da sonst Kreuzreaktionen oder Fehlfärbungen vorkommen könnten. Der 2. Antikörper und der 3. AK würden dann in späteren Färbungsschritten alles unspezifisch markieren und so die ganze Untersuchung wertlos machen.

Diese Technik der Doppelfärbung wurde in der Untersuchung z.B. bei verschiedenen MMPs oder TIMPs mit Vimentin, Smooth Muscle α – actin, CD3 oder CD 68 durchgeführt, um eine Verbindung der jeweiligen beiden spezifischen Strukturen zu prüfen und darzustellen.

Tabelle 6 (Tab. 6) Doppelfärbung

Schritt	Durchführung/Vorgehensweise	Dauer
1.	Fixierung und Vorbereitung: d) Aceton (-20°C) (zuerst 10 Minuten Lufttrocknung bei Raumtemperatur) e) 4% Paraformaldehyd (Raumtemperatur) f) Carnoy`s Lösung (Raumtemperatur) Die Wahl der Fixierung ist abhängig vom verwendeten Antikörper	10 Minuten
2.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
3.	Inkubation und Blockung der nicht-spezifischen-Bindungsstellen mit Bovine Serum Albumin (BSA)	10 Minuten
4.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten

5.	Nach Trocknen Auftragen des 1. Antikörpers (1. AK) in den verschiedenen Konzentrationen Je Schnitt 30 µl der Lösung auf dem Präparat verteilen	Über Nacht (8-12 Stunden)
6.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
7.	Nach gründlichem Trocknen kann der 2. Antikörper (2. AK) in der jeweiligen Verdünnung aufgetragen werden; Je Schnitt 30 µl der Lösung auf dem Präparat verteilen c) Direkte Methode (2. AK und 3. AK direkt miteinander gekoppelt) d) Indirekte Methode (nur 2. AK)	1 – 2 Stunden
8.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
9. Nur bei 7 b)	Nach gründlichem Trocknen kann der 3. Antikörper (3. AK) in der jeweiligen Verdünnung aufgetragen werden; Je Schnitt 30 µl der Lösung auf dem Präparat verteilen	a) ICTP, PINP und PIIINP: 45 Minuten b) bei allen anderen: 30 Minuten
10.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
11.	Nach Trocknen Auftragen des Zweiten 1. Antikörpers (1. AK(2)) in den verschiedenen Konzentrationen und Verdünnungen; Je Schnitt 30 µl der Lösung auf dem Präparat verteilen	Über Nacht (8-12 Stunden)
12.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
13.	Nach gründlichem Trocknen kann der	1 – 2 Stunden

	<p>2. Antikörper (2. AK(2)) in den jeweiligen Verdünnungen aufgetragen werden;</p> <p>Je Schnitt 30 µl der Lösung auf dem Präparat verteilen</p> <p>e) Direkte Methode (2.AK und 3. AK direkt miteinander gekoppelt)</p> <p>f) Indirekte Methode (nur 2. AK)</p>	
14.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
15.	<p>Nach gründlichem Trocknen kann der 3. Antikörper (3. AK(2)) in der jeweiligen Verdünnung aufgetragen werden;</p> <p>Je Schnitt 30 µl der Lösung auf dem Präparat verteilen</p>	<p>a) ICTP, PINP und PIINP: 45 Minuten</p> <p>b) bei allen anderen: 30 Minuten</p>
16.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
17.	Im Anschluss danach wird der Kern mit 4',6-Diamidino-2'-phenylindol - Dihydrochlorid (DAPI) angefärbt	Ca. 30 Minuten
18.	Waschen in PBS	3 x 3 Minuten
19.	Nach Trocknung Verschließen und Eindeckeln mit Mowiol	

2.2.3 Verwendete Antikörper

In den folgenden Kapiteln werden alle für die Studie verwendeten Antikörper und Farbstoffe aufgeführt und vorgestellt. Siehe Tabelle 7, Tabelle 8, Tabelle 9 und Tabelle 10.

2.2.3.1 Verwendete 1. Antikörper

Tabelle 7 (Tab. 7) Verwendete 1. Antikörper

Name des Antikörpers	Firma	Verdünnung/ Konzentration	Art des Antikörpers
MMP2	Biotrend	1:70	Sheep-IgG
MMP8	Sigma	1:70	Rabbit-IgG
MMP9	Biotrend	1:70	Sheep-IgG
MMP19	Sigma	1:70	Rabbit-IgG
TIMP1	Calbiochem	1:100	Rabbit-IgG
TIMP2	Calbiochem	1:100	Sheep-IgG
TIMP3	Sigma	1:100	Rabbit-IgG
TIMP4	Sigma	1:100	Rabbit-IgG
Smooth Muscle α – aktin	Sigma	1:100	Mouse-IgG
Vimentin	Sigma	1:300	Rabbit-IgG
CD3	Dako	1:50	Mouse-IgG
CD68	Dako	1:50	Mouse-IgG
ICTP	Geschenk einer befreundeten Forschergruppe	1:300	Rabbit-IgG
PINP	Geschenk einer befreundeten Forschergruppe	1:300	Rabbit-IgG

PIIINP	Geschenk einer befreundeten Forschergruppe	1:300	Rabbit-IgG
IIINTP	Geschenk einer befreundeten Forschergruppe	1:300	Rabbit-IgG
Kollagen I	Sigma	1:100	Mouse-IgG
Kollagen III	Sigma	1:100	Rabbit-IgG

2.2.3.2 Verwendete 2. Antikörper

Tabelle 8 (Tab. 8) Verwendete 2. Antikörper

Name des 2. Antikörpers	Firma	Verdünnung
Biotin-conjugated Anti-Mouse IgG Antikörper	Dianova	1:200
Biotin-conjugated Anti-Rabbit IgG Antikörper	Dianova	1:200
Biotin-conjugated Anti-Sheep IgG Antikörper	Dianova	1:200

2.2.3.3 Verwendete 3. Antikörper

Tabelle 9 (Tab. 9) Verwendete 3. Antikörper

Name des 3. Antikörpers	Firma	Verdünnung	Farbe/Spektrum
CY2-conjugated Streptavidin	Rockland	1:100	grün
CY3-conjugated Streptavidin	Rockland	1:100	rot

2.2.3.4 Kernfarbstoffe

Tabelle 10 (Tab. 10) Verwendete Kernfarbstoffe

Name	Firma	Angriffsort	Verdünnung	Farbe/Spektrum
4',6-Diamidino-2'-phenylindol - Dihydrochlorid (DAPI)	Molecular Probes	Kerne	1:200	blau

2.2.4 Lagerung der Schnitte

Die Präparate wurden bei +4°C im Kühlschrank vom Tageslicht geschützt gelagert. Dadurch wird einer Veränderung der morphologischen Strukturen und dem Verlust der Fluoreszenzfärbung entgegengewirkt.

2.3 Mikroskopie und Bildaufnahme

2.3.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

2.3.1.1 Lichtmikroskopie

Um die Hämatoxilin-Eosin-Präparate beurteilen zu können, wurde ein Lichtmikroskop des Typs Leica DM-RB benutzt.

Es wurden folgende Objektive hierfür benutzt:

- PL Fluotar 25x/0,75 OIL, von Leica Germany
- PL Fluotar 40x/1,00 – 0,50 OIL, auch von Leica Germany
- PL APO 63x/1,40 OLI, von Leica Germany

Auf diese Weise konnte man sich schnell einen guten strukturellen Eindruck verschaffen und fehlerhafte Präparate eliminieren.

2.3.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine gute Möglichkeit, besondere Strukturen mit Hilfe von immunhistologischen Färbetechniken darzustellen. Zu diesem Zweck wurden unsere Präparate immunhistologisch markiert und mit fluoreszierendem Färbstoff gekoppelt. Diese Schnitte können dann mit einem speziellen Fluoreszenzmikroskop in Auflichttechnik untersucht werden (Leica DMRB, siehe hierzu Tab. 5). Hierzu werden die fluoreszierenden Farbstoffe an den spezifischen Bindungsstellen mit verschiedenen Filtern und mit Licht in verschiedenen Wellenlängen sichtbar gemacht und dargestellt. Mit dem Zwischenschalten diverser Filter verschiedener Wellenlängenbereiche ließen sich auch die unterschiedlichen angefärbten Strukturen sichtbar machen.

Tabelle 11 (Tab. 11) Verwendete Farbstoffe und deren Anregungsbereiche

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungsbereich/Wellenlängen in nm	Farbe
CY2-conjugated Streptavidin	488	Grün
CY3-conjugated Streptavidin	550	Rot
4',6-Diamidino-2'-phenylindol - Dihydrochlorid (DAPI)	359	Blau

2.3.1.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie werden wie bei der einfachen Fluoreszenzmikroskopie spezielle Strukturen immunhistologisch gefärbt und mit Hilfe eines speziellen Mikroskops dargestellt. Der fluoreszierende Farbstoff wird mit Licht bestimmter Wellenlänge (z.B. Quecksilber-Dampf-Lampe oder Laserlicht) an den markierten Strukturen zum Leuchten gebracht.

Die so durch das konfokale Mikroskop (Leica TCS SP) hergestellten digitalen Bilder wurden zur Weiterverarbeitung und Sicherung in einem speziellen Programm (Leica Confocal Software) gespeichert.

Im konfokalen Mikroskop werden die Lichtstrahlenbündel zuerst durch ein Prisma geleitet und dann durch den Einsatz von Blenden in den entsprechenden Wellenbereichen eingegrenzt.

Weiter kann man durch Wahl des entsprechenden Lasers das Lichtspektrum, welches angeregt wird, beschränken. Es ist möglich durch die konfokale Mikroskopie, Einzelbilder oder serielle Schichtaufnahmen eines Schnittes in verschiedenen Ebenen zu machen. Bei dem in dieser Untersuchung verwendeten Gerät (Leica TCS SP) standen drei verschiedene Laserarten mit ihren spezifischen Spektren zu Verfügung.

Laserarten und Hauptspektren:

- Argon => 458 nm
- Krypton => 488 nm
- Helium-Neon => 568-633 nm

Es wurden folgende Objektive von Leica benutzt:

- HC PL APO 20 x / 0,70 IMM CORR
- HCX PL APO 40 x / 1,25 – 0,75 OIL
- HCX PL APO 63 x / 1,32 – 0,6 OIL

Be- oder weiter verarbeitet wurden die Fluoreszenzbilder mit dem Programm Imaris (Bitplane, Zürich, Schweiz).

2.3.1.4 Herstellung von Bildern, welche später zur Quantifizierung benutzt wurden

Für diese Untersuchung wurde ein Leica DM-RB-Fluoreszenzmikroskop und ein 40x Plan Apo-Objektiv von Leica verwendet. Als Kamera kam ein digitales Bildaufnahmesystem DC 200 von Leica zum Einsatz. Das dazugehörige Computerbildaufnahmeprogramm ist IM 500 von Leica. Dies ist ein Datenbank-gestütztes Bildverarbeitungsprogramm. Die Bilder wurden im JPG-Format auf der Festplatte gespeichert und später auf CD, DVD oder einem anderen geeigneten Speichermedium gesichert.

Um Bilder anzufertigen, die zur Quantifizierung geeignet sind, musste für jede angefärbte spezifische Struktur ein standardisiertes Bildaufnahmeprotokoll erstellt werden. Dieses Protokoll war bei der Herstellung aller Bilder eines Antikörpers gleich. So konnte die Gleichheit garantiert und Verfälschungen ausgeschlossen werden. In der folgenden Tabelle (Tab.12) werden diese für die Bildherstellung wichtigen Protokolle für jede angefärbte spezifische Struktur und die dazu verwendeten Antikörper aufgelistet. Bestandteile dieser Protokolle sind Belichtungszeit, Verstärkung und Farbsättigung. Diese können aber je nach verwendetem Gerät zur Bildherstellung, Schnittdicke, Farbintensität und Technik geringfügig variieren.

Bei dieser Untersuchung waren es folgende Filter:

- für Grün: **L4**
- für Rot: **N2.1**
- für Blau: **A**

Tabelle 12 (Tab. 12) Verwendete Bildherstellungsprotokolle/Einstellungen

Name des Antikörpers	Belichtungszeit	Verstärkung	Farbsättigung
MMP2	2,2s	4,0 x	2,25 x
MMP8	2,0s	4,0 x	2,25 x
MMP9	2,2s	4,0 x	2,25 x
MMP19	2,0s	4,0 x	2,25 x
TIMP1	2,0s	4,0 x	2,25 x
TIMP2	2,2s	4,0 x	2,25 x
TIMP3	2,2s	4,0 x	2,25 x
TIMP4	2,0s	4,0 x	2,25 x
ICTP	100 ms	3,0x	2,25x
PINP	350 ms	3,0x	2,25x
PIINP	250 ms	3,0x	2,25x

2.3.1.5 Herstellung von konfokalen Fluoreszenz-Bildern für die Beurteilung der spezifischen Strukturen

Hierfür wurden die Präparate mit doppel-immunhistologischen Färbungen am konfokalen Mikroskop (Leica TCS SP) und der entsprechenden Software (Leica Confocal Software) bearbeitet. Die daraus entstandenen Bilderserien wurden mit dem Computerprogramm Imaris Workstation der Firma Silikon Graphics überarbeitet und digital gesichert. Alle Bilder einer Färbung wurden nach streng festgelegtem Ablauf und Einstellung gemacht, um die Standardisierung und Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Verwendete Farbstoffe und deren Spektren siehe Tabelle 11.

2.4 Messung der Fluoreszenzintensität und Quantifizierung

2.4.1 Messverfahren, Messung, Quantifizierung und statistische Auswertung

2.4.1.1 Messverfahren und Messung

Um eine standardisierte Auswertung der Bilder zu gewährleisten, wurde ein festgelegter Ablauf immer eingehalten. Sämtliche Bilder wurden mit Hilfe des Programms ImageJ bearbeitet und gemessen. Bei den Messungen eines Antikörpers bestanden immer die gleichen Einstellungen, und es wurden immer die exakt gleichen Schritte durchgeführt. Es wurde eine Intensitätsmessung durchgeführt, in gewissen Grenzen bereinigte Rohdaten übertragen und in Tabellen zusammengefasst.

ImageJ misst in einem vorgegebenen Areal die Intensität gewisser Wellenlängen/ Farben.

Unter Bereinigung versteht sich hierbei, dass man obere und untere Grenzwerte der Intensität festlegt, welche in die Intensitätskalkulation einbezogen werden. Werte, die unter dem unteren Grenzwert oder über dem oberen Grenzwert liegen, werden nicht gewertet und ausgesondert, da sie die Quantifizierung verfälschen könnten. Diese Messungen wurden für alle Bilder der Personengruppen und Kontrollgruppe für die verschiedenen Antikörper gemacht und zusammengetragen.

2.4.1.2 Quantifizierung und statistische Auswertung

Für die quantitative Analyse wurden alle Schnitte immunhistologisch gleich behandelt. Es wurden exakt die gleichen Färbungsverfahren, 1.-, 2.-, und 3. AK in gleichen Konzentrationen benutzt. Proben, die als Kontrollgewebe dienten, wurden ebenso behandelt, nur mit dem Unterschied, dass dabei der 1. AK durch PBS-Lösung ersetzt wurde. Alle anderen Schritte im Verfahren sind identisch mit den anderen Schnitten. Es wurden, wie oben beschrieben, von jeder Gruppe ausreichend und repräsentative Bilder gemacht und später mit Image J bearbeitet. Die daraus entstandenen Daten wurden wie nachfolgend beschrieben ausgewertet.

Falls nicht anders dargestellt, sind alle Daten als Mittelwert \pm SD angegeben.

Unterschiede zwischen den Gruppen wurden durch Benutzung des zweiseitigen unabhängigen T-Tests oder des Mann-Whitney-U-Tests für zwei Vergleichsgruppen berechnet. Für mehrseitige Vergleiche wurde ANOVA benutzt, darauffolgend wurden die Daten mit dem Bonferroni T-Test analysiert. Unterschiede wurden als signifikant erachtet, wenn $P < 0.05$.

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistologische Färbungen

3.1.1. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und TIMPs

Da diese Färbungstechnik für alle MMPs und TIMPs benutzt wurde, stellen wir hier exemplarisch nur einige vor und gehen dann im Anschluß sofort zu der graphischen Darstellung der quantitativen Ergebnisse.

In den folgenden Bildern ist die Färbung von MMP2 in den verschiedenen Patientengruppen dargestellt. Man kann im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 6A) eine leichte Zunahme der Fluoreszenz und damit der MMP2-Konzentration in der koronaren Herzkrankheitsgruppe Remote-Zone (Abbildung 6C) feststellen. Ein starker Anstieg des MMP2-Spiegels ist in der Gruppe der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie (DCM; Abbildung 6B) und der koronaren Herzkrankheit Border-Zone (Abbildung 6D) dargestellt.

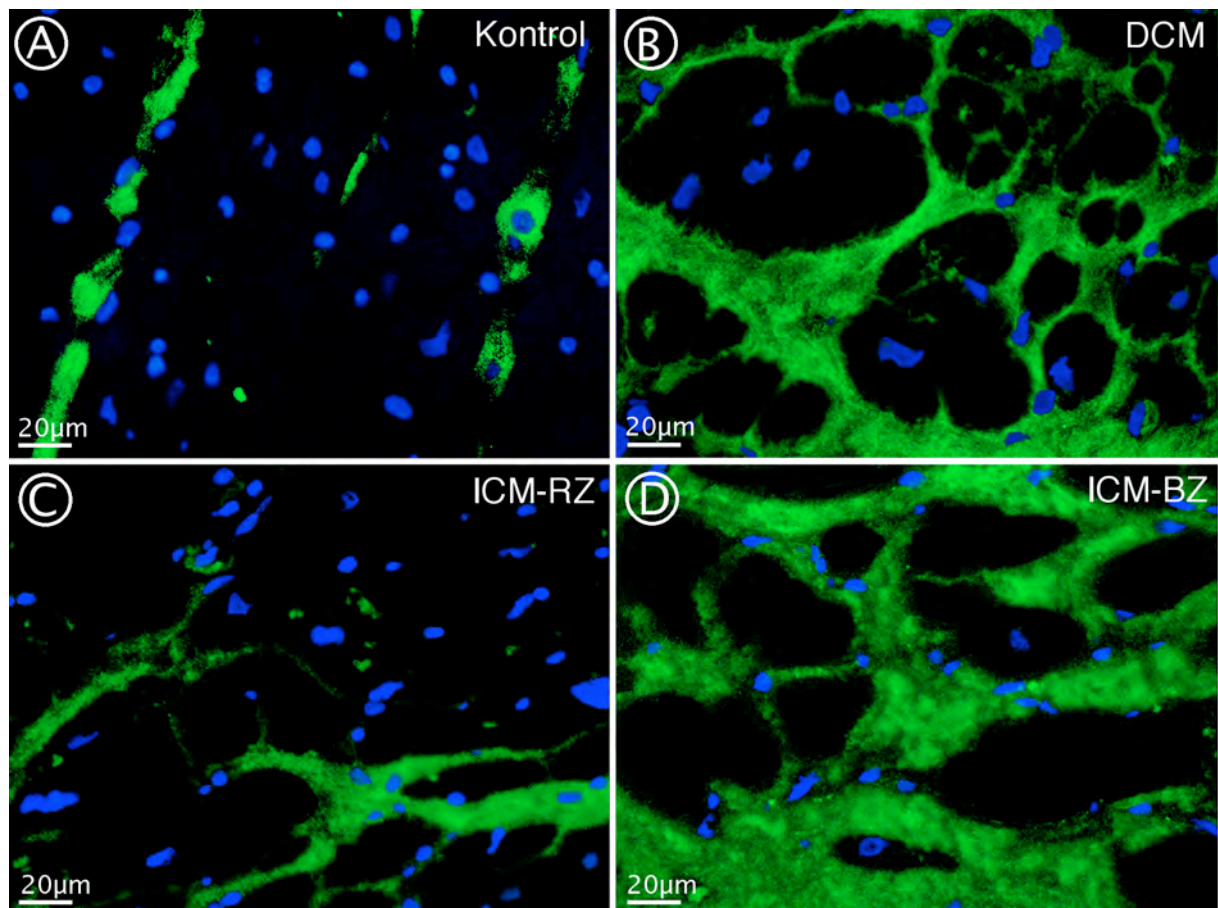


Abb. 6 A und B Dieses Bild zeigt eine Zweifachfärbung von MMP2 (grün) und einer Kernfärbung mit DAPI (blau) an einem Kontrollgewebsschnitt. Diese Farbeinteilung gilt für alle vier Abbildungen. Im Kontrollgewebe befindet sich wenig MMP2, im DCM-Gewebe ist MMP2 stark vermehrt. Abb.6 C Das Bild zeigt eine deutliche Erhöhung des MMP2-Spiegels im Gewebe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit, Remote-Zone. Abb.6 D Bei der Gruppe koronarer Herzkrankheit, Border-Zone, ist wie bei der DCM-Gruppe eine erhebliche MMP2-Erhöhung dargestellt. In der ECM ist eine hohe Dichte von MMP2 vorhanden.

3.1.2 Verschiedene MMPs in Verbindung mit Smooth Muscle α -Aktin, CD3, CD 68 und Vimentin

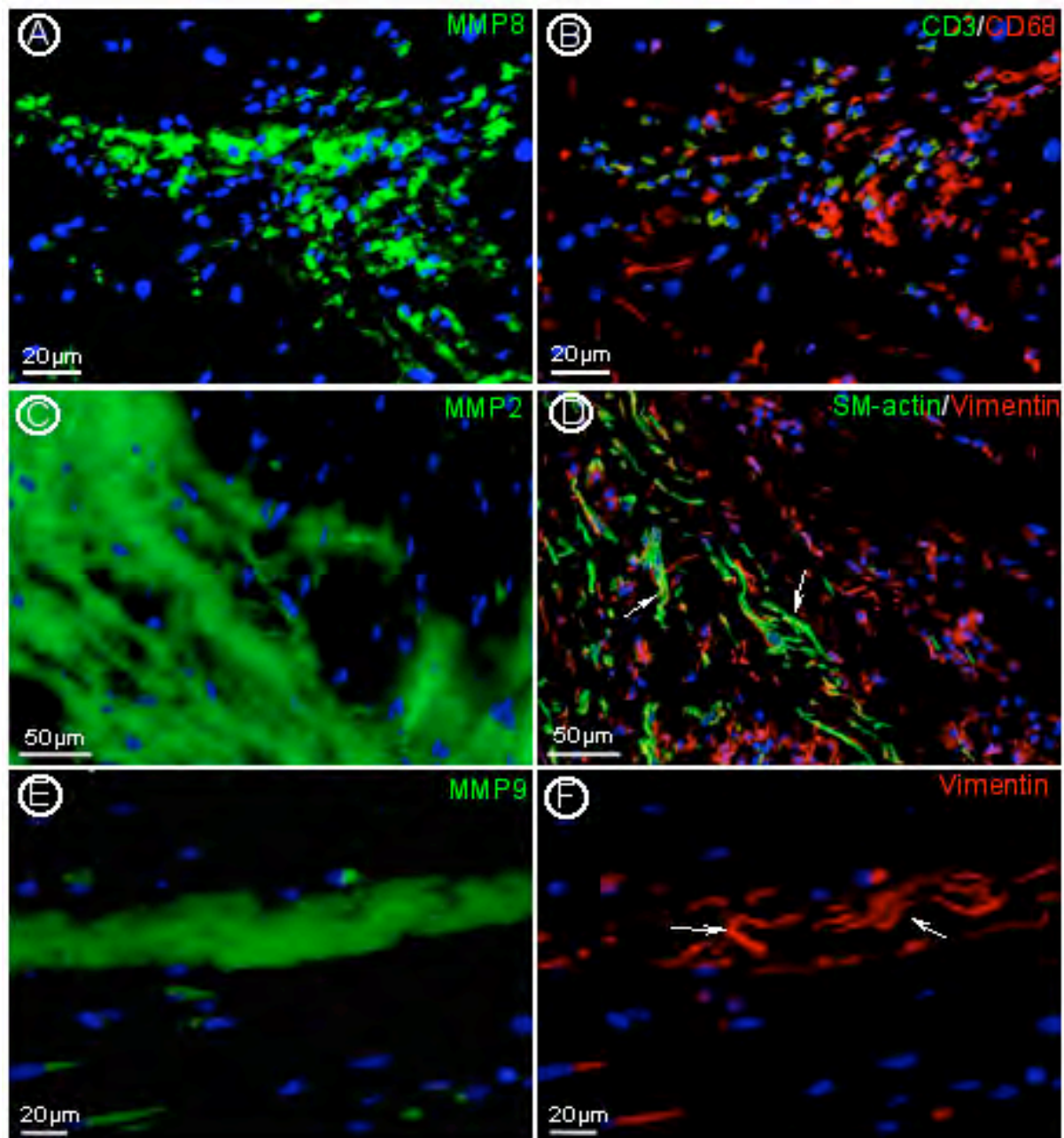


Abb. 7 Synthese der MMPs von verschiedenen Zelltypen:

- A zeigt MMP8 (grün) mit Kernfärbung (DAPI, blau). In B wurden CD3 (grün), CD68 (rot) und die Kerne (blau) im selben Schnitt gefärbt, um die Gemeinsamkeiten besser zu verdeutlichen.
- C und D zeigen eine MMP2- (grün, C), Smooth Muscle α – aktin- (grün, D), Vimentin- (rot, D) und Kernfärbung (blau) im gleichen Gewebe.
- In E und F wurde MMP9 (grün, E) in Verbindung mit Vimentin (rot, F) dargestellt

3.1.3 Färbungen mit IIINTP

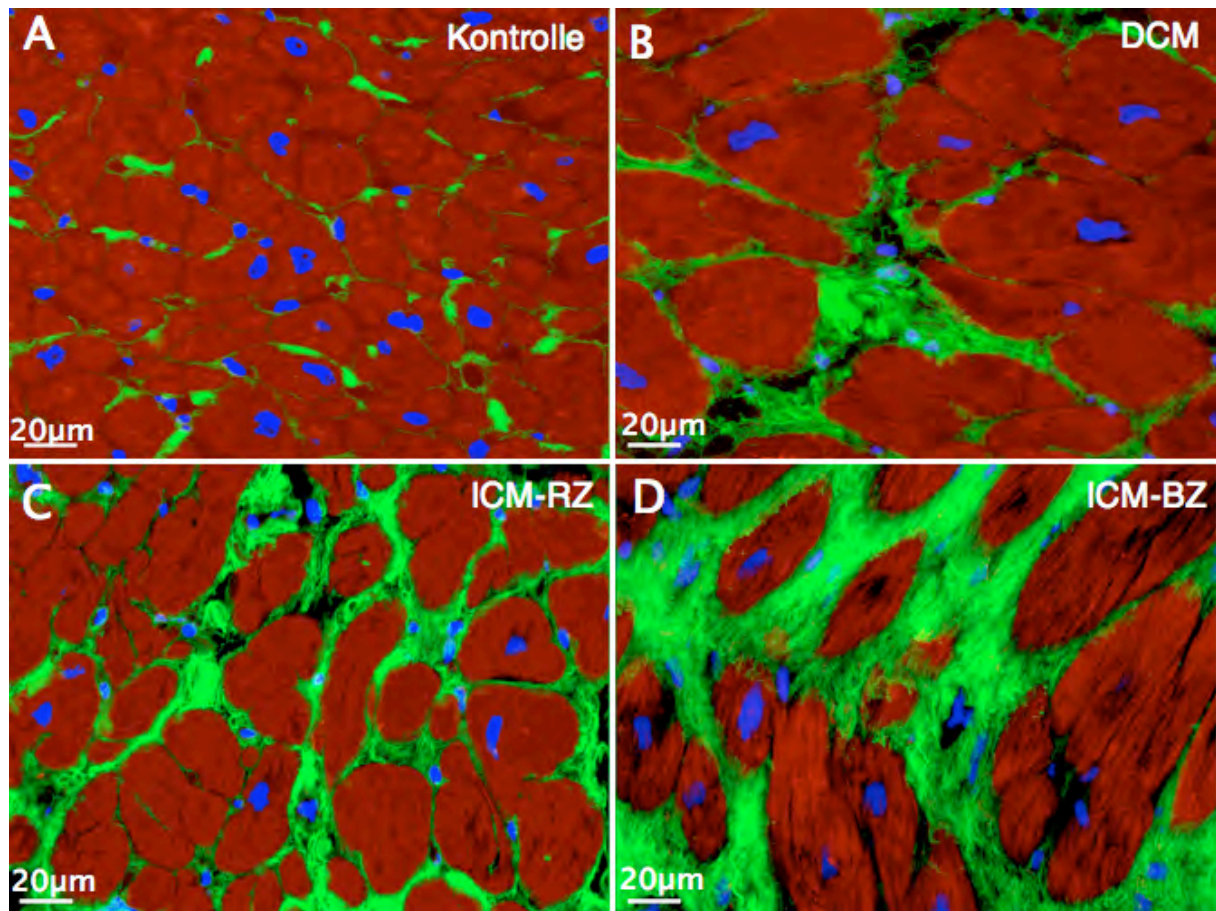


Abb. 8 IIINTP ist grün dargestellt, Myozyten sind rot gefärbt, und die Zellkerne wurden blau (DAPI) gefärbt.

In Abschnitt A ist das Kontrollgewebe angefärbt worden. In B), C) oder D) die jeweiligen Präparate der einzelnen zu untersuchenden Krankheiten.

Es zeigt, dass in der ECM der DCM-, ICM-RZ- und ICM-BZ-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erheblich größere Konzentration von IIINTP vorhanden ist. Am ausgeprägtesten ist dies in den ICM-BZ-Schnitten zu finden.

3.1.4 Darstellung von Kollagen I und Kollagen III

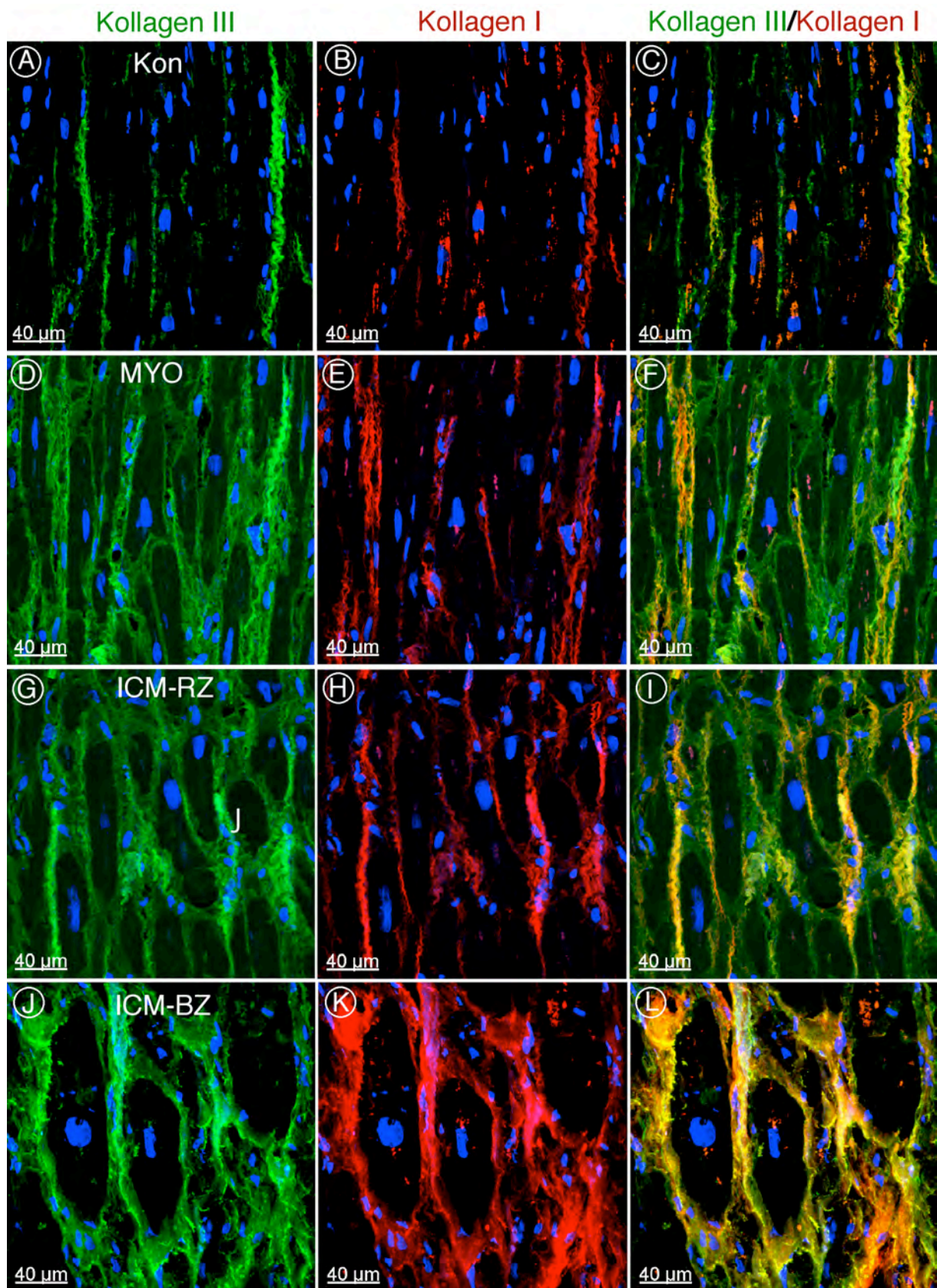


Abb. 9 (siehe S. 46) Kollagen I ist rot, Kollagen III grün, und die Zellkerne sind blau (Dapi) dargestellt.

In Abschnitt A, B, C ist das Kontrollgewebe angefärbt worden. In D, E und F werden Bilder der Myokarditisgruppe gezeigt. In G, H, I, J, K und L werden Färbungen der ICM-Gewebegruppen aufgezeigt.

Es stellt sich auch hierbei eine deutliche Erhöhung von Kollagen I und Kollagen III in den Mykarditis-, ICM-RZ-, ICM-BZ-Bildern dar. In der Kontrollgruppe sind diese Kollagene auch vorhanden, aber deutlich weniger ausgeprägt.

3.2 Quantitative Auswertung und Darstellung

Die hier gezeigten Daten und Werte, besonders die Prozentangaben, sind immer gegen die Kontrollgruppe gerechnet und so dargestellt.

3.2.1. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

3.2.1.1 MMP 2

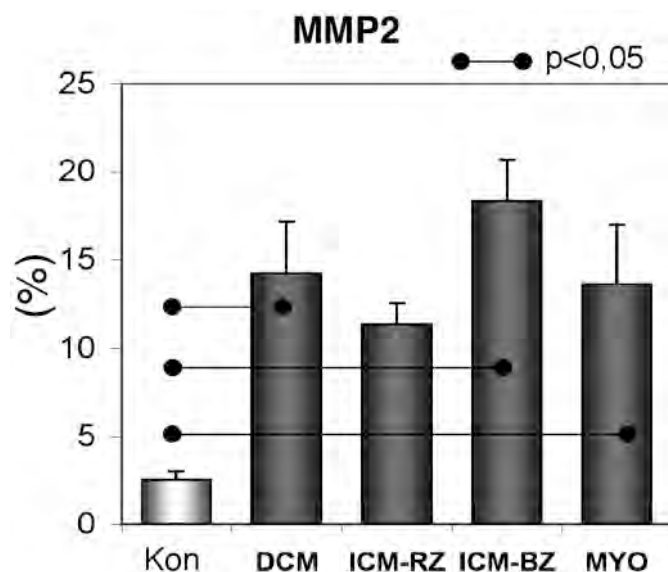


Abbildung 10 (Abb. 10)

Abb. 10 Quantitative Messung von MMP2. Es kommt bei allen kardialen Erkrankungen zu einer starken MMP2-Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe. Besonders auffällig hierbei ist eine Steigerung bei der ICM-BZ um 617%, bei der DCM um 467% und bei MYO um 425%. MMP2 nimmt auch in der ICM-RZ-Gruppe erheblich zu (350%), diese Zunahme ist aber schwächer ausgeprägt als bei den anderen Krankheiten.

3.2.1.2 MMP 8

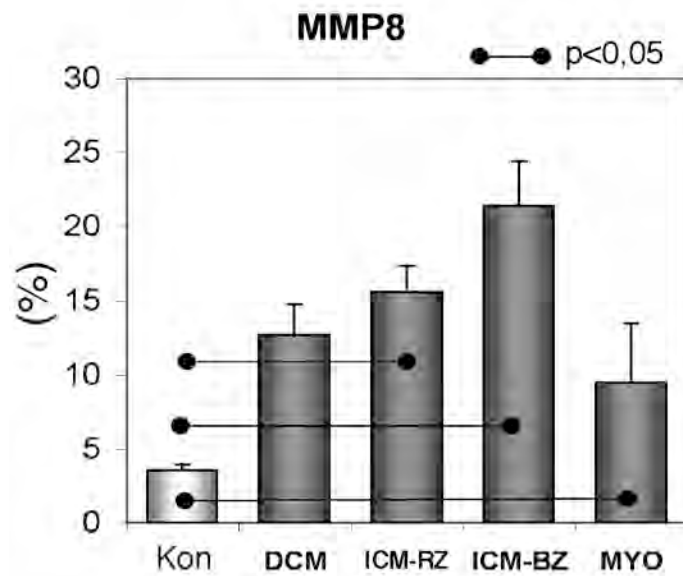


Abbildung 11 (Abb. 11)

Abb. 11 Hier wird die MMP8-Messung präsentiert. Deutliche Erhöhungen von MMP8 bei allen Patienten, besonders bei der ICM-BZ-Gruppe. In der ICM-BZ kam es zu einer Hochregulation um 500%, in der ICM-RZ um 343%, bei der DCM-Gruppe um 257% und in der MYO um noch 171%.

3.2.1.3 MMP 9

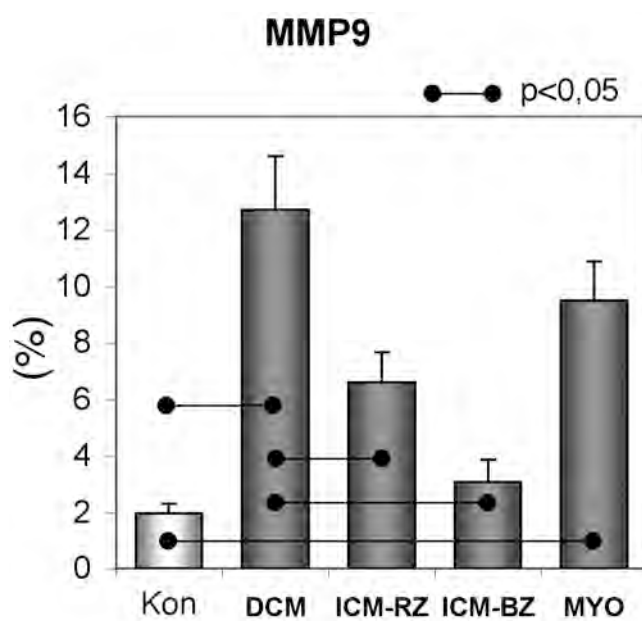


Abbildung 12 (Abb. 12)

Abb. 12 (siehe S. 48) Hier werden die Ergebnisse von MMP9 dargestellt. Auch hier kommt es in allen Geweben zu einer Hochregulierung von MMP9. Herausstechend ist die starke Erhöhung in der DCM- (514%) und MYO-Gruppe (357%). In der ICM-BZ war diese Veränderung mit 43% am niedrigsten ausgeprägt.

3.2.1.4 MMP 19

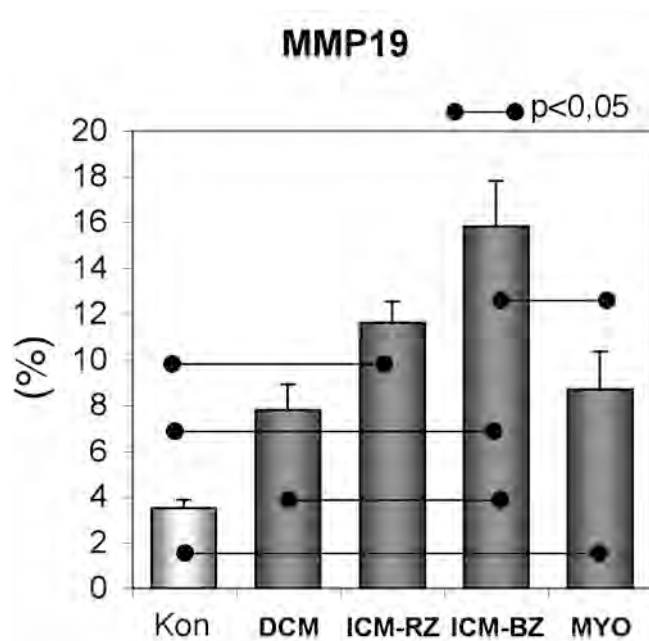


Abbildung 13 (Abb. 13)

Abb. 13 Bei MMP-19 ist gleichfalls eine Steigerung des MMP19 in allen Bereichen festgestellt worden. Diese Steigerung ist am deutlichsten in der ICM-BZ (330%) und der ICM-RZ (220%) ausgeprägt, gefolgt von den Myokarditispatienten (140%). Am geringsten ist sie in der DCM-Gruppe, aber mit 120% immer noch sehr deutlich.

3.2.2. Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs)

3.2.2.1 TIMP 1

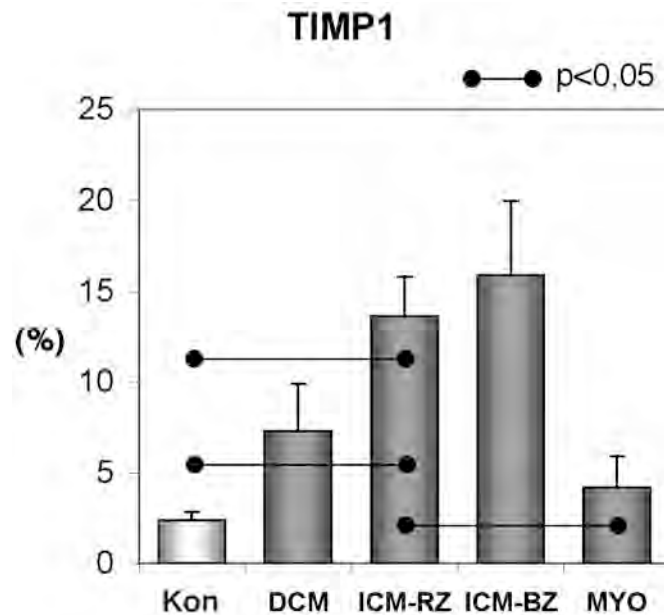


Abbildung 14 (Abb. 14)

Abb. 14 Dies zeigt die TIMP1-Konzentrationen im untersuchten Gewebe. Hierbei kommt es besonders in den ischämischen Gruppen zu einer massiven Erhöhung, ICM- BZ (533%) und ICM- RZ (450%). Dagegen ist die Steigerung in der DCM- (200%) und MYO-Gruppe (67%) eher gering ausgeprägt.

3.2.2.2 TIMP 2

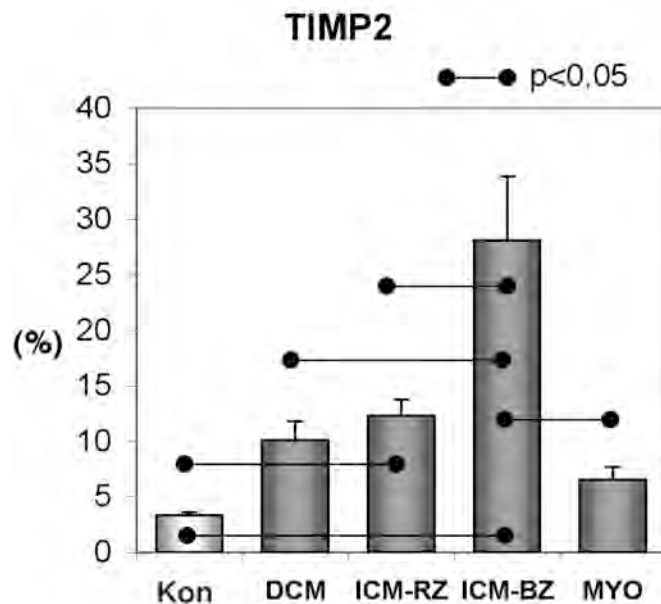


Abbildung 15 (Abb. 15)

Abb. 15 Bei TIMP2 stellen sich die Ergebnisse verschieden dar. Beim ICM-BZ-Gewebe wurde eine sehr hohe Konzentration von TIMP2 entdeckt (740%). Bei den anderen Proben war eine leichte Steigerung zu erkennen. DCM (200%) und ICM-RZ (280%) stiegen auch an, aber nicht in dem Maße wie ICM-BZ. Das Schlusslicht bildete die MYO-Gruppe (100%).

3.2.2.3 TIMP 3

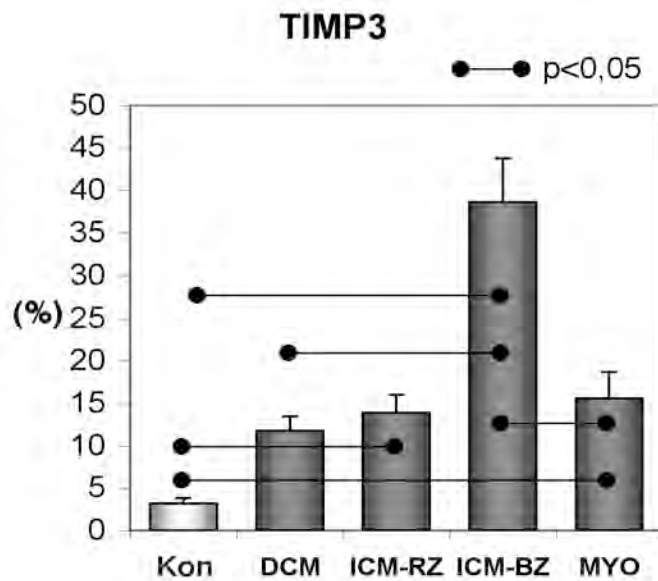


Abbildung 16 (Abb. 16)

Abb. 16 Auch bei TIMP3 haben wir eine extreme Erhöhung in den ICM-BZ-Proben (1050%) aufzeigen können. Die anderen drei Krankheitsgruppen wiesen eine Steigerung auf, aber nicht in demselben Ausmaß. MYO (375%), ICM-RZ (325%) und DCM (250%).

3.2.2.4 TIMP 4

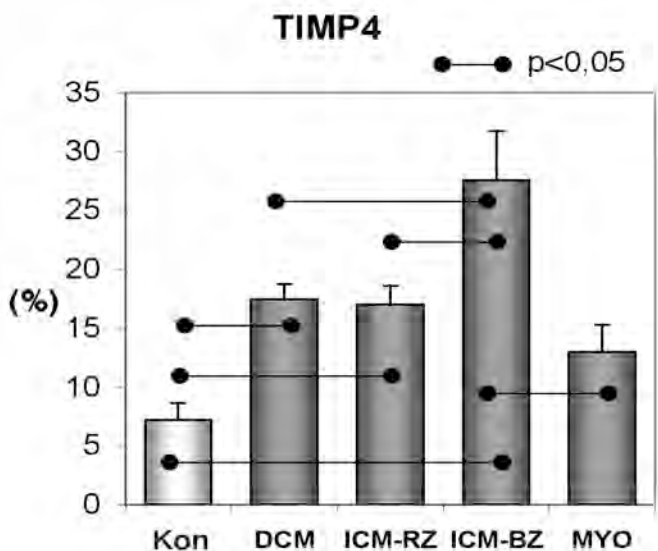


Abbildung 17 (Abb. 17)

Abb. 17 Bei TIMP4 haben wir eine Hochregulierung in allen kranken Geweben gefunden. Am größten ist diese in der ICM-BZ (292%), gefolgt von DCM (150%) und ICM-RZ (142%). Das Schlusslicht bildet die MYO-Gruppe (83%).

3.2.3 Kollagene und Prokollagene

3.2.3.1 ICTP

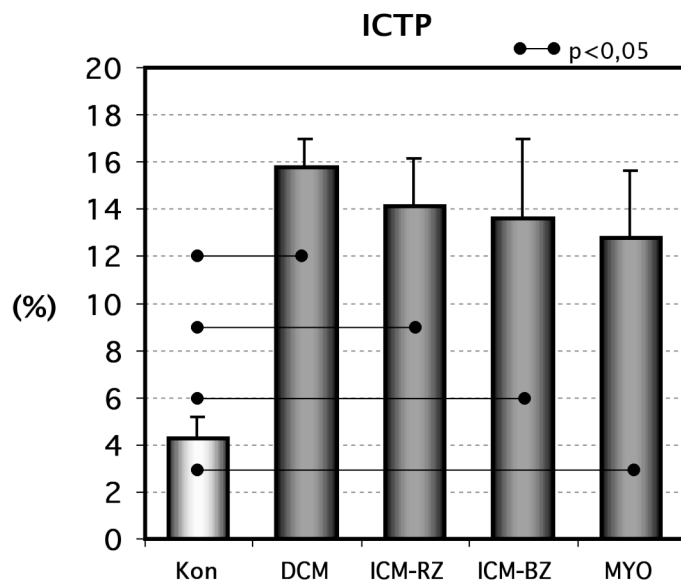


Abbildung 18 (Abb. 18)

Abb. 18 Bei der Färbung von ICTP fanden wir generell eine Steigerung. Die Werte aller Gruppen liegen sehr eng beisammen. ICM-RZ (231%), DCM (270%), ICM-BZ (220%) und MYO (200%).

3.2.3.2 PINP

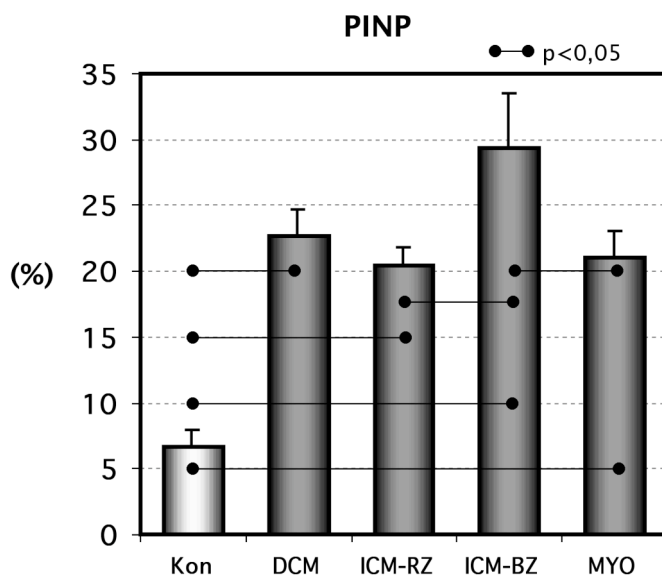


Abbildung 19 (Abb. 19)

Abb. 19 Auch bei PINP ist eine allgemeine starke Erhöhung zu erkennen. Am ausgeprägtesten ist diese im ICM-BZ-Gewebe (337%), gefolgt von DCM (239%), MYO (214%) und ICM-RZ (204%).

3.2.3.3 PIIINP

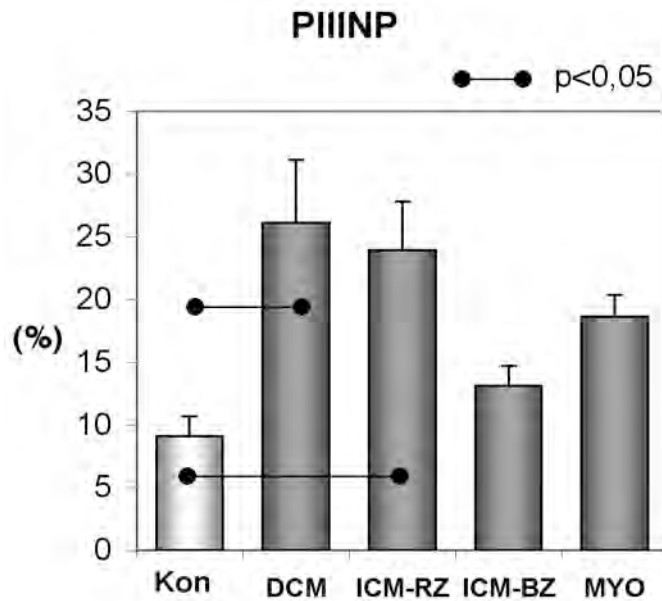


Abbildung 20 (Abb. 20)

Abb. 20 Bei PIIINP stellten sich die Ergebnisse ein wenig anders dar. Hierbei kommt es bei den DCM-Patienten zur größten Konzentrationssteigerung (200%). Eine deutliche Erhöhung ist auch in der ICM-RZ- (173%) und der MYO-Gruppe (113%) festzustellen. Nur eine geringe Änderung ist im ICM-BZ-Gewebe zu finden.

3.2.3.4 IIINTP

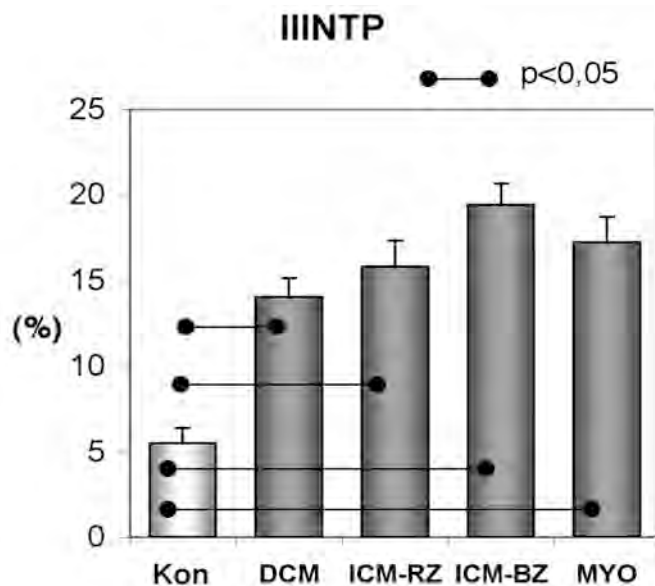


Abbildung 21 (Abb. 21)

Abb. 21 Bei IIINTP stellt sich auch eine Steigerung in allen Gewebearten dar. ICM-BZ- (254%) und MYO-Gruppe (215%) haben die größte Hochregulierung, dicht gefolgt von ICM-RZ (192%) und DCM (154%).

3.2.3.5 Kollagen I

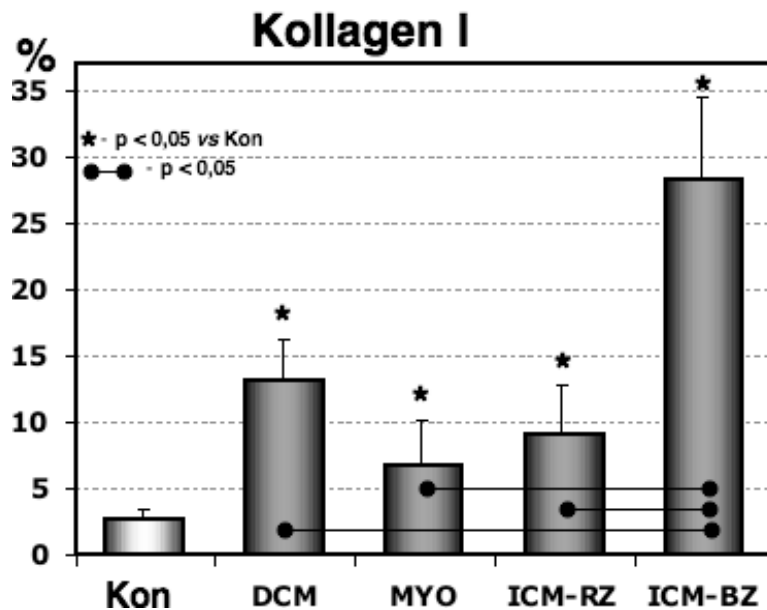


Abbildung 22 (Abb. 22)

Abb. 22 Bei der quantitativen Auswertung von Kollagen I fällt besonders die Zunahme in der ICM-BZ-Gruppe (800%) auf. Es kommt in den anderen drei Krankheiten zu einer viel schwächeren Zunahme an Kollagen I. DCM (340%), MYO (140%) und ICM-RZ (200%)

3.2.3.6 Kollagen III

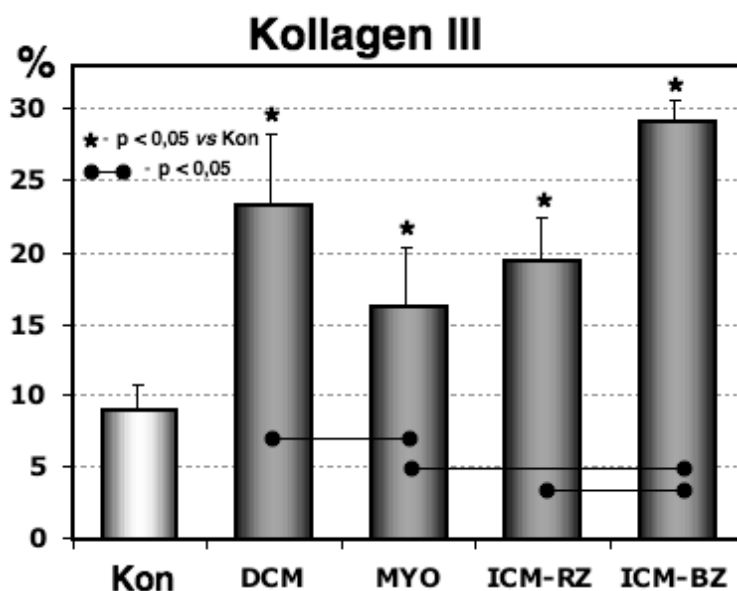


Abbildung 23 (Abb. 23)

Abb. 23 Die Auswertung von Kollagen III zeigt einen allgemeinen Anstieg, besonders stark bei ICM-BZ (231%) und DCM (163%). ICM-RZ (119%) und MYO (81%) sind auch erhöht, aber nicht so stark wie die anderen beiden Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.2.3.7 Verhältnis von Kollagen III zu Kollagen I

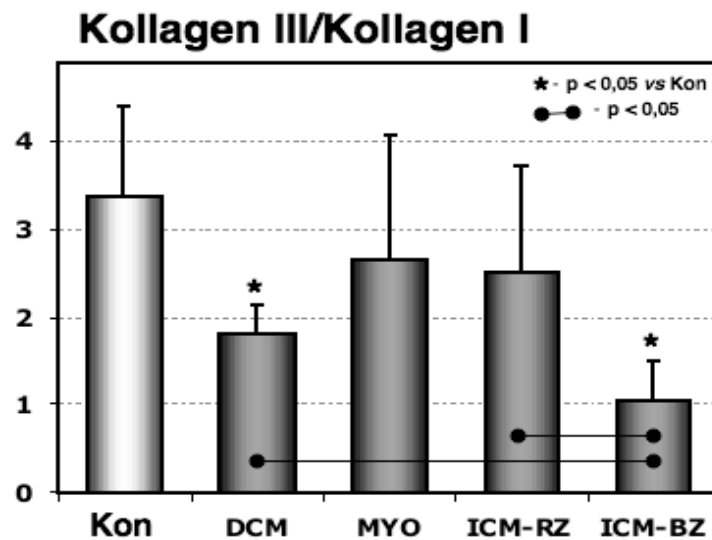


Abbildung 24 (Abb. 24)

Abb. 24 zeigt die Verhältnisse von Kollagen III zu Kollagen I in den verschiedenen untersuchten Gruppen. Es zeigt sich eine Veränderung in diesem Verhältnis in den einzelnen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es kommt in allen 4 Gruppen zu einer Verkleinerung des Kollagen III/Kollagen I – Verhältnisses. Besonders ausgeprägt ist dies in der DCM- und ICM-BZ-Gruppe

3.2.3.8 Verhältnis von Kollagen III/Kollagen I zu linksventrikulärem enddiastolischem Druck

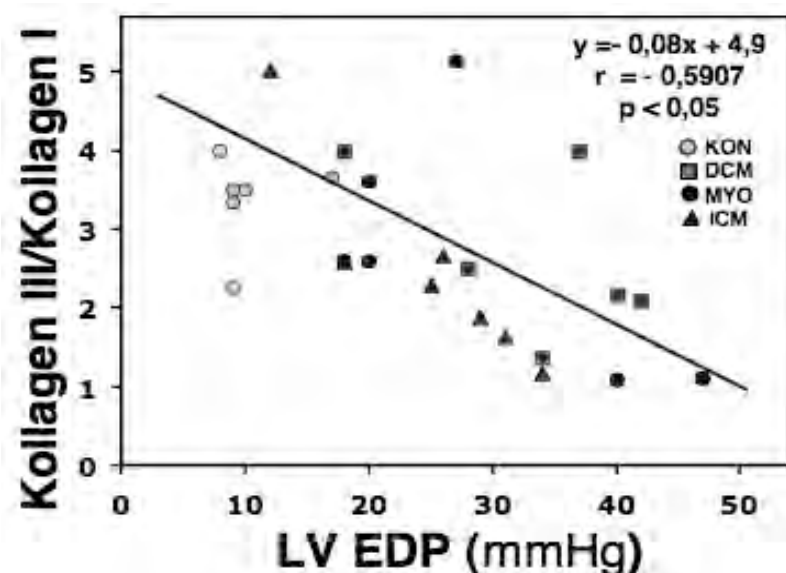


Abbildung 25 (Abb. 25)

Abb. 25 zeigt die Verhältnisse von Kollagen III /Kollagen I zu dem linksventrikulären enddiastolischen Druck in den verschiedenen untersuchten Gruppen.

3.2.3.9 Verhältnis von Kollagen I zu linksventrikulärem enddiastolischem Druck

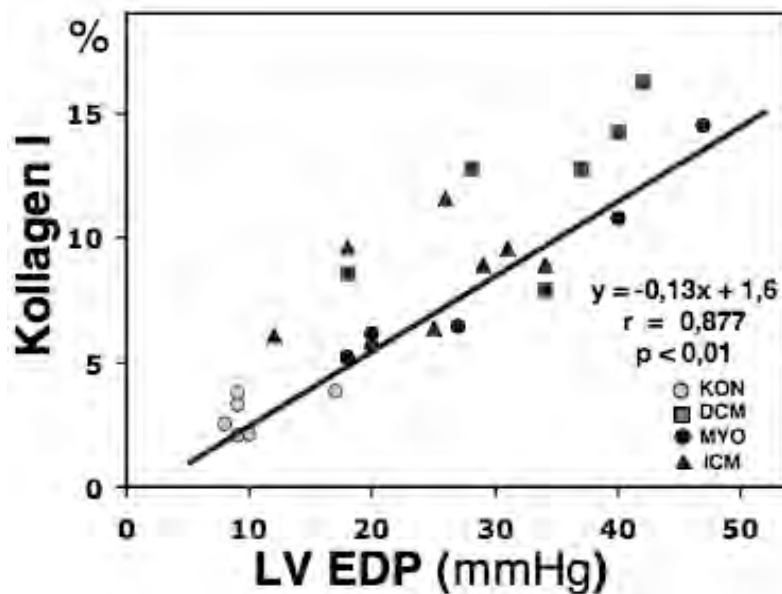


Abbildung 26 (Abb. 26)

Abb. 26 zeigt die Verhältnisse von Kollagen I zu dem linksventrikulären enddiastolischen Druck in den verschiedenen untersuchten Gruppen.

3.2.3.10 Verhältnis von Kollagen III zu linksventrikulärem enddiastolischem Druck

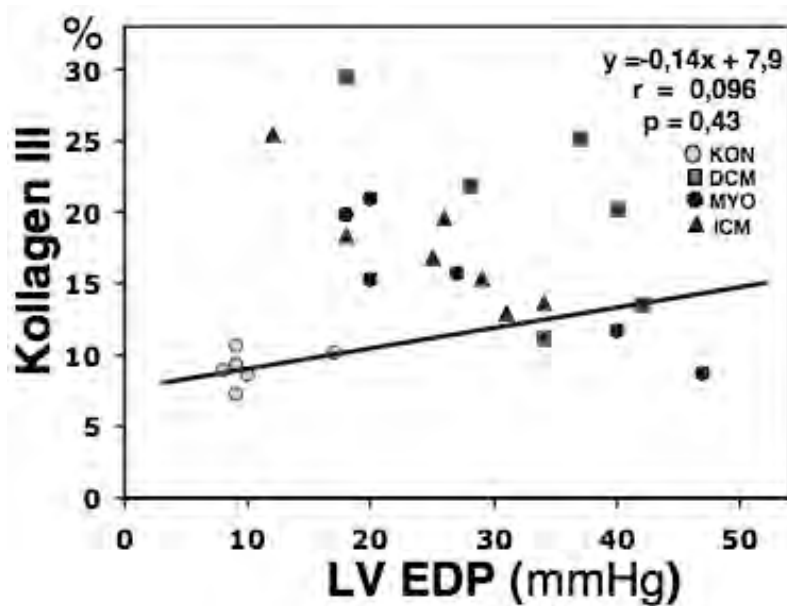


Abbildung 27 (Abb. 27)

Abb. 27 zeigt die Verhältnisse von Kollagen III zu dem linksventrikulären enddiastolischen Druck in den verschiedenen untersuchten Gruppen.

4. Diskussion

4.1 MMPs und TIMPs bei Herzerkrankungen

In der vorliegenden Arbeit sind bei allen Patienten mit DCM, ICM und MYO erhebliche und kennzeichnende Veränderungen der MMP-, TIMP-, Kollagen I und III-Konzentrationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt worden. Viele andere Forschergruppen haben gleichfalls diese Veränderungen oder dieses Ungleichgewicht bei idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (DCM) [16, 19-23, 27], Myokarditis (MYO) [24-27] und koronarer Herzerkrankung (Ischemic cardiomyopathy, ICM; Remote - und Border -Zone) [12, 28-37] beschrieben.

Im folgenden Text sollen die hier gewonnenen Befunde mit denjenigen aus der Literatur verglichen und diskutiert werden.

4.1.1 MMPs

Wir fanden in den verschiedenen Gruppen einen Anstieg der MMP in unterschiedlicher Ausprägung.

MMP-2 war bei allen untersuchten Krankheiten heraufreguliert. Seine stärkste Ausprägung fanden wir in der ICM-BZ-Zone und die schwächste in der ICM-Remote-Zone. MMP-2 hat eine entscheidende Funktion beim Abbau und Wiederaufbau des geschädigten Gewebes und der ECM. Seine Produktion wird durch viele verschiedene Einflüsse hochreguliert. Hierbei spielen Interleukine, TNF- α , TGF- β , Fibroblastenaktivität, Fibronectin, Zellen der Immunabwehr und die Collagenproduktion eine wichtige Rolle [40-43]. Es existiert auch ein sogenanntes Pro-MMP-2, welches durch bestimmte Einflussfaktoren (Zellschäden, Immunabwehraktivitäten, sinkende MMP-2-Spiegel usw.) oder andere MMPs reaktiv in das aktive MMP-2 umgewandelt werden kann [12, 38, 40]. Welche Bedeutung dieser Wechsel bei den Um- bzw. Abbauprozessen hat, werden weitere Studien zeigen. MMP-2 ist eine universelle Protease, welche viele Strukturen der ECM (vor allem die verschiedenen Kollagene) zersetzen und abbauen kann. Außerdem wurde bei MMP-2 eine hohe Sensibilität auf die oben beschriebenen

Einflussfaktoren und Veränderungen beobachtet. [44] MMP-2 wird ständig produziert und ist in gewissem Umfang immer an bestimmten Umbau- und Erneuerungsprozessen an der ECM beteiligt [27]. Bei überschießender Expression kommt es zu gravierenden Veränderungen wie Fibrosen, Dysfunktionen bestimmter Gewebeteile (z.B. Bandscheibenveränderungen [41]), Strukturveränderungen in der ECM (z.B. Abbau und Umbau der dort enthaltenen Kollagene), Stabilitätsverlust (z.B. nach Myokardinfarkt, Aneurysma).

In der vorliegenden Arbeit stellt sich diese in der Literatur beschriebene Hochregulierung von MMP-2 bei den verschiedenen Herzerkrankungen klar heraus und lässt nur die Schlussfolgerung zu, dass MMP-2 bei allen hier beschriebenen Veränderungen des Gewebes eine wichtige Rolle bei Ab- und Umbau der ECM-Bestandteile, besonders der Kollagene, spielt. Es scheint, dass die Höhe der Konzentration von MMP-2 einen direkten Einfluss auf die Stärke und Ausprägung der Veränderungen in der ECM hat und diese eine der entscheidenden Proteasen ist.

Auch die Protease MMP-8 ist deutlich hochreguliert. Besonders deutlich waren die Veränderungen bei den Patientengruppen mit KHK (Ischemic cardiomyopathy, ICM) (BZ 500%, RZ 343%). Dies könnte darauf hinweisen, dass Sauerstoffmangel ein sehr starker Stimulus für die Produktion und Ausschüttung von MMP-8 ist. Sauerstoffmangel und die damit verbundenen Veränderungen wurden schon als Stimulus für die MMP-Synthese beschrieben[42]. MMP-8 wird besonders stark von Neutrophilen gebildet. Bei Sauerstoffmangel oder einem dadurch verursachten Schaden kommt es vermehrt zu einer Einwanderung von Neutrophilen in das betroffene Gewebe. Dies könnte eine Steigerung von MMP-8 in diesem Gewebe erklären. Dieser Aspekt, ob MMP-8 speziell auf Sauerstoffmangel reaktiv besonders stark im Herzgewebe gebildet wird, ist noch spekulativ und muss noch in weiteren Untersuchungen genauer erforscht werden. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, können dies aber nicht klar darstellen. Es könnte auch zu dieser MMP-8-Erhöhung bei dem allgemeinen Hochregulieren der MMP-Synthese im Rahmen der Gewebsveränderungen und der damit verbundenen Stimuli gekommen sein, oder durch die vermehrte Einwanderung und Produktion durch Neutrophile.

Ein starkes Ansteigen von MMP-9 wurde bei der DCM (514%) und der MYO (357%) beobachtet. Dies deckt sich mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen für DCM und MYO [12, 16, 19-27, 45, 48, 51, 56, 59]. MMP-9 ist gleichfalls eine der MMPs, welche sehr schnell hochreguliert und gebildet werden, wie z.B. MMP-2 auch. MMP-9 gilt auch als eine Protease, welche verschiedene denaturierte Kollagene und Membranproteine, wie Kollagen IV, Fibronectin und Laminin, abbaut [61]. Besonders in entzündetem Gewebe und durch Zellen der Immunabwehr soll MMP-9 verstärkt gebildet werden. Bei unseren Ergebnissen ist sehr auffallend, dass es nur in der DCM- und MYO-Gruppe zu einem mit MMP-2 fast

vergleichbaren Anstieg kommt. Bei der ischämischen Kardiomyopathie scheint das MMP-9 nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies weist auf eine besondere Hochregulierung von MMP-9 durch besonders in DCM und MYO vorkommende Stimuli und Mechanismen hin. Auch in Betracht gezogen werden könnte eine spezielle Hemmung der Synthese von MMP-9 in den ICM-Gruppen. Dafür habe ich aber keinen Hinweis in meinen Ergebnissen gefunden. Auch von MMP-9 ist eine inaktive Vorstufe bekannt, welche durch andere MMPs (z.B. MMP-14) aktiviert werden [38, 40] und in begrenztem Rahmen proteolytisch wirken kann. Wie und in welchem Umfang dies hier eine wichtige Rolle spielen könnte, kann ich mit unseren Daten nicht abschätzen, da wir diese Vorstufen nicht gezielt untersucht haben. Ein sehr interessanter Forschungsansatz in der Zukunft ist herauszufinden, auf welche Stimuli besonders die MMP-9-Synthese sensibel reagiert in den einzelnen Krankheitsbildern, d.h. ob es signifikante Unterschiede zu der Stimulation der Synthese anderer MMPs gibt, und in welchem Umfang dies geschieht.

MMP-19 ist ein erst spät entdecktes MMP und repräsentiert eine Unterklasse der MMPs. Es hat eine große potenzielle Aktivität, Strukturen der ECM zu spalten und ist in der Lage, mehrere Substrate der ECM zu verarbeiten. Deshalb war es für uns in dieser Arbeit besonders wichtig, auch dieses MMP zu untersuchen und für die verschiedenen Krankheitsgruppen darzustellen. Außerdem wird MMP-19 eine Tendenz zur Autoaktivierung zugeschrieben [38, 39], was großen Einfluss auf ihre Hemmung oder Herunterregulierung zu haben scheint, da die TIMPs nur aktive MMPs binden und somit teilweise hemmen können. Diese Möglichkeit der Autoaktivierung und Deaktivierung macht die Rolle des MMP-19 sehr undurchsichtig, da dadurch eine Einschätzung ihrer Aktivität und Potenz nach dem jetzigen Kenntnisstand fast unmöglich gemacht ist. Dieses Gebiet ist aber leider noch nicht ausreichend erforscht und sicher Gegenstand weiterer Untersuchungen.

In unserer Studie konnten wir eine Hochregulierung der MMP-19-Konzentration in allen Geweben im Vergleich zum Kontrollgewebe feststellen. Besonders hoch war die Steigerung im ICM-BZ- (330%) und ICM-RZ-Gewebe (220%). Dies zeigt die nicht zu unterschätzende Einflussnahme von MMP-19 auf den Umbauprozess in der ECM. Diese Zusammenhänge lassen MMP-19 als einen wichtigen Baustein im Prozess des „Remodelling“ des Herzens erscheinen.

4.1.2 TIMPS

TIMPs binden an die aktivierten MMPs und reduzieren durch diese Bindung 75% des MMP-Proteolysepentials. Sie sind wichtige Regulierungsfaktoren für die MMPs und deren Aktivität in der ECM [12]. Einige Studien haben Veränderungen in der MMP- und TIMP-Konzentration bei verschiedenen Krankheiten vorgestellt [12, 16, 21, 23, 27, 31, 41] und deren Zusammenhänge durch ein sog. Fließgleichgewicht beschrieben.

Die verschiedenen TIMPs können nur aktive MMPs binden und somit blockieren. Vorstufen oder deaktivierte MMPs sind von ihrer Aktivität nicht oder nur in sehr kleinem Umfang betroffen.

Bei allen vier untersuchten TIMPs wurde in unserer Studie eine signifikante Erhöhung in der ICM-BZ-Gruppe beobachtet. In der DCM-, ICM-RZ- und Myo-Gruppe kam es auch zu einer geringfügigen Erhöhung. Dies weist auf eine Veränderung des betroffenen Gewebes hin, wodurch die Zellen auf den durch MMP verursachten Abbau- und Umbau von ECM-Komponenten mit Hilfe einer Hochregulierung der TIMPs und ihrer MMP-hemmenden Wirkung reagieren. Der Abbau der Kollagene durch MMP wird dadurch verlangsamt oder sogar weitgehend gestoppt, und so wird es ermöglicht, neues Kollagen in das betreffende Gewebe zu integrieren. Die TIMP-Hochregulierung ist ein Schutzmechanismus gegen überschießenden Kollagenabbau und die damit verbundene Instabilität des Gewebes bei ungebremstem Gewebeumbau. Unsere Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass die Annahme wahrscheinlich ist, dass hohe MMP-Konzentrationen eine Hochregulierung der TIMP-Synthese verursachen und einen möglichen Kompensationsversuch für deren proteolytische Aktivität darstellen.

Dies scheint besonders wichtig bei der Regulierung der ICM-BZ zu sein. In diesem Gewebe ist vermutlich ein kontrollierter Umbau der ECM und damit verbundene sog. Wiederherstellungsphasen (Erholungsphasen) erforderlich, um die Stabilität zu gewährleisten. In der DCM-, ICM-RZ- und MYO-Gruppe ist dies anscheinend in diesem großen Umfang nicht nötig, erfolgt erst zu einem anderen, noch nicht genau bestimmbar Zeitpunkt oder durch andere noch nicht bekannte Stoffe.

Um dies genauer darzustellen, wurde für alle MMPs und TIMPs in den verschiedenen Krankheiten das TIMP/MMP-Verhältnis berechnet. Diese Werte (TIMP/MMP) lauten: Kontrolle $1,29 \pm 0,10$; DCM $1,08 \pm 0,19$; Myo $0,74 \pm 0,13$; ICM-RZ $1,41 \pm 0,18$; ICM-BZ $1,90 \pm 0,12$. Hierbei ist die ICM-BZ-Gruppe besonders auffällig. Das Verhältnis ist in dieser Gruppe um circa 2:1 auf Seiten der Inhibitoren verschoben. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass in der ICM-BZ-Gruppe ein besonderes Bedürfnis an Regulierung der MMPs und damit eines geordneteren Umbaus besteht.

4.1.3 Prokollagene und Kollagene

Bei PINP, ICTP und IIINTP wurde eine starke Hochregulierung in allen Patientengruppen beobachtet. Das bedeutet eine fast gleichmäßige Zunahme der Prokollagene für Kollagen I und III, deren Quotient jedoch immer bei 1 lag, woraus geschlossen werden kann, dass Abbau und Neusynthese des Kollagens im Gleichgewicht sind. Dies verdeutlicht die Anpassungsreaktion des Gewebes auf die Um- und Abbauprozesse. Dies wurde auch schon früher in anderen Studien und Geweben beobachtet [47, 49, 50]. Auch bei PIIINP fanden wir bei allen Krankheiten eine Steigerung der Konzentration, aber in unterschiedlicher Ausprägung. Im DCM- (200%) und ICM-RZ-Gewebe (173%) war diese am ausgeprägtesten, dicht gefolgt vom MYO-Gewebe (113%). In der Gruppe ICM-BZ war diese am schwächsten sichtbar. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ein großer Bedarf an Kollagenen besteht und dafür die entsprechenden Vorstufen produziert und bereitgestellt werden, um dieser Anforderung gerecht zu werden.

Die Werte für die Kollagene stellten sich ein wenig anders dar.

Bei Kollagen I wurde eine enorme Hochregulierung in der ICM-BZ-Gruppe (800%) gefunden. In den anderen Patientengruppen kam es auch zu einer Zunahme, aber nicht in diesem Ausmaß. Dies spricht für einen erstaunlichen Bedarf und Syntheseleistung von Kollagen I im ICM-BZ-Gewebe. Dies erfolgt wahrscheinlich, um die Stabilität des Gewebes wieder herzustellen, um besonders Rupturen zu verhindern. In kleinerem Umfang geschieht dies anscheinend auch in den anderen Gruppen, jedoch in viel geringeren Dimensionen (z.B. DCM (340%) und ICM-RZ (200%)).

Bei ICM-BZ sind die TIMPS am stärksten heraufreguliert, d.h. die MMPs werden vermutlich stark gehemmt, und Kollagen I kann in großer Menge gebildet werden.

Kollagen III erfährt auch bei diesen Umbauprozessen eine große Steigerung der Konzentration in allen von uns untersuchten Proben. Nur ist diese Hochregulierung gleichmäßiger ausgeprägt und nicht so unterschiedlich wie bei Kollagen I. Wir konnten in allen Geweben eine Zunahme feststellen (z.B. ICM-BZ (231%) und MYO (81%)). Auch bei Kollagen III ist die größte Zunahme in der ICM-BZ-Gruppe zu finden. Dies spricht wiederum dafür, dass in dieser Gruppe viel Kollagen I und III gebraucht und eingebaut wird, um die Stabilität des Gewebes zu erhalten. Es kommt bei gewissen Krankheitsbildern dadurch zur vermehrten Kollagensynthese und zum gezielten Einbau der verschiedenen Kollagene. Unsere Ergebnisse zeigen diese Tendenz und Schlussfolgerung klar auf.

Eine Kollagensynthesesteigerung kann auch zu einer Fibrose führen, die bei den hier untersuchten Krankheiten gefunden wurde. Eine gewisse Fibrosierung in bestimmten Geweben kann jedoch auch einen Ruptur- und Aneurysmaschutz darstellen.

Es scheint, dass dieses Zusammenspiel von MMPs, TIMPs und der Kollagensynthese ein sehr sensibles System mit vielen Verflechtungen ist. Nur eine Kleinigkeit oder Unstimmigkeit kann darüber entscheiden, ob es zu einer positiven Entwicklung des Gewebes kommt oder nicht, ob es eine Fibrose mit Funktionseinschränkung wird oder eine Stabilisierung des durch die MMPs geschwächten Gewebes.

Um die Rolle von Kollagen I und III hierbei besser zu verstehen, wurden im nächsten Schritt das Verhältnis KollagenI/KollagenIII, das Kollagen I und das Kollagen III für die verschiedenen Gruppen mit dem linksventrikulären enddiastolischen Druck (LV-EDP) verglichen (Abb.25-27). Hierbei war nur für das Kollagen I ein signifikanter Zusammenhang festzustellen. Kollagen I und der LV-EDP wiesen einen linearen Zusammenhang auf. Je höher der Kollagen I-Anteil im Gewebe war, umso höher war auch der LV-EDP.

Dies bedeutet, dass es durch Kollagen I zu einer verbesserten Stabilität des Gewebes (z.B.: Rupturschutz) kommt, aber im Gegenzug die Kontraktilität des Gewebes und damit die Herzarbeit linear abnimmt. Dadurch steigt auch der LV-EDP an. Es existiert zwischen dem Kollagen I, der Herzarbeit und dem LV-EDP eine sensible Verbindung, welche für den Verlauf der Krankheit eine entscheidende Rolle spielen kann.

Um eine bessere und klarere Verdeutlichung der Abläufe und deren Folgen darzustellen, habe ich im nächsten Abschnitt mein Schema für die Zusammenhänge von MMPs, TIMPs, Prokollagenen und Kollagen I und III dargestellt.

4.2 Vorstellung des bisherigen Schemas und unserer schematischen Darstellung zur Erklärung der Befunde und Zusammenhänge nach unseren Vorstellungen

In der Literatur zu MMPs und TIMPs war kein zufriedenstellendes Schema zur Erklärung der in der Arbeit beschriebenen Zusammenhänge zu finden. Da dies aber wichtig ist, musste aus der Arbeit heraus ein eigenes Schema für die MMPs, TIMPs, Pro-Kollagene und Kollagene gefunden werden, in dem die Zusammenhänge und die Kontroll- und Regulierungsmechanismen klar werden. Viele Forschergruppen beschreiben bei den einzelnen Herzerkrankungen eine Erhöhung der MMPs, TIMPs und Kollagene [19-45] und deren

Auswirkungen auf den Verlauf der Erkrankung. Am Ende steht sehr häufig dabei die Myokardfibrose und eine damit verbundene Funktionseinschränkung des Herzens, aber wie es dazu kommt, wird meistens nur angeschnitten, spekuliert oder ist mit dem heutigen Wissen nur schwer zu erklären. Ein Schema wird oft nicht erstellt, da leider in diesem Bereich noch viele Mechanismen unerforscht sind. Viele Forscher verwenden für ihre Erklärungen ein einfacheres Schema. Dieses Schema nenne ich das Gleichgewichtsschema von MMP und TIMP.

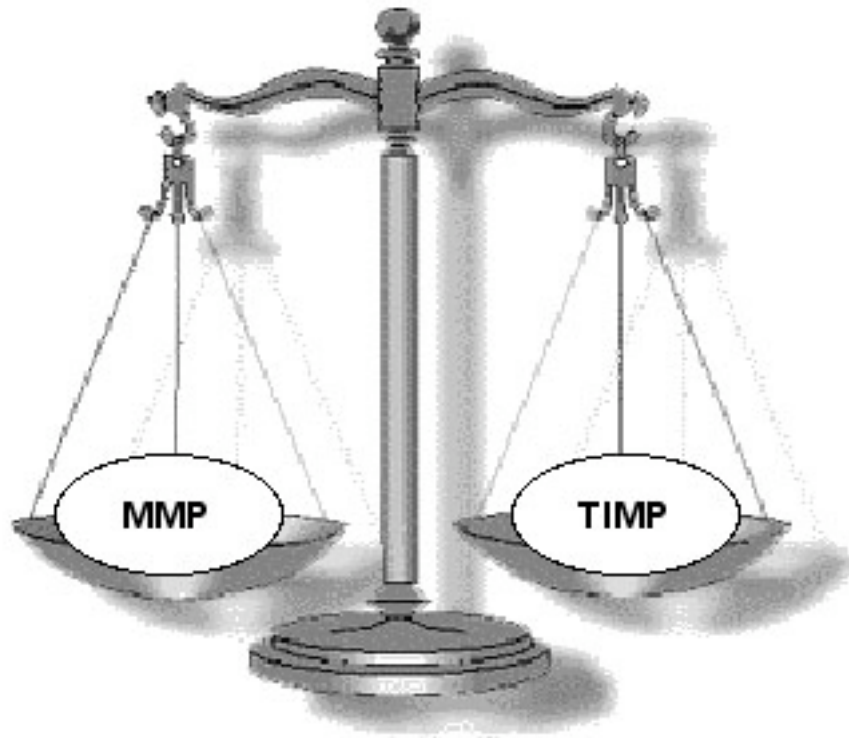


Abbildung 28 (Abb. 28): Bisher verwendet, das Gleichgewichtsmodell der MMPs und TIMPs

Man geht davon aus, dass die MMPs und TIMPs sich in einem Fließgleichgewicht befinden, d.h. sie befinden sich normalerweise in der ECM in einem ausgeglichenen Verhältnis (Abb. 10, 11). Dies führt dazu, dass ohne schwerwiegende äußere oder innere Stimuli der Abbau und der Aufbau in der ECM im Gleichgewicht sind und Kollagenabbau und –aufbau in gleichem Verhältnis betrieben werden. Durch besondere Einwirkungen kann dieses sensible Verhältnis von MMPs und TIMPs gestört werden und zu einer Veränderung in der ECM führen.

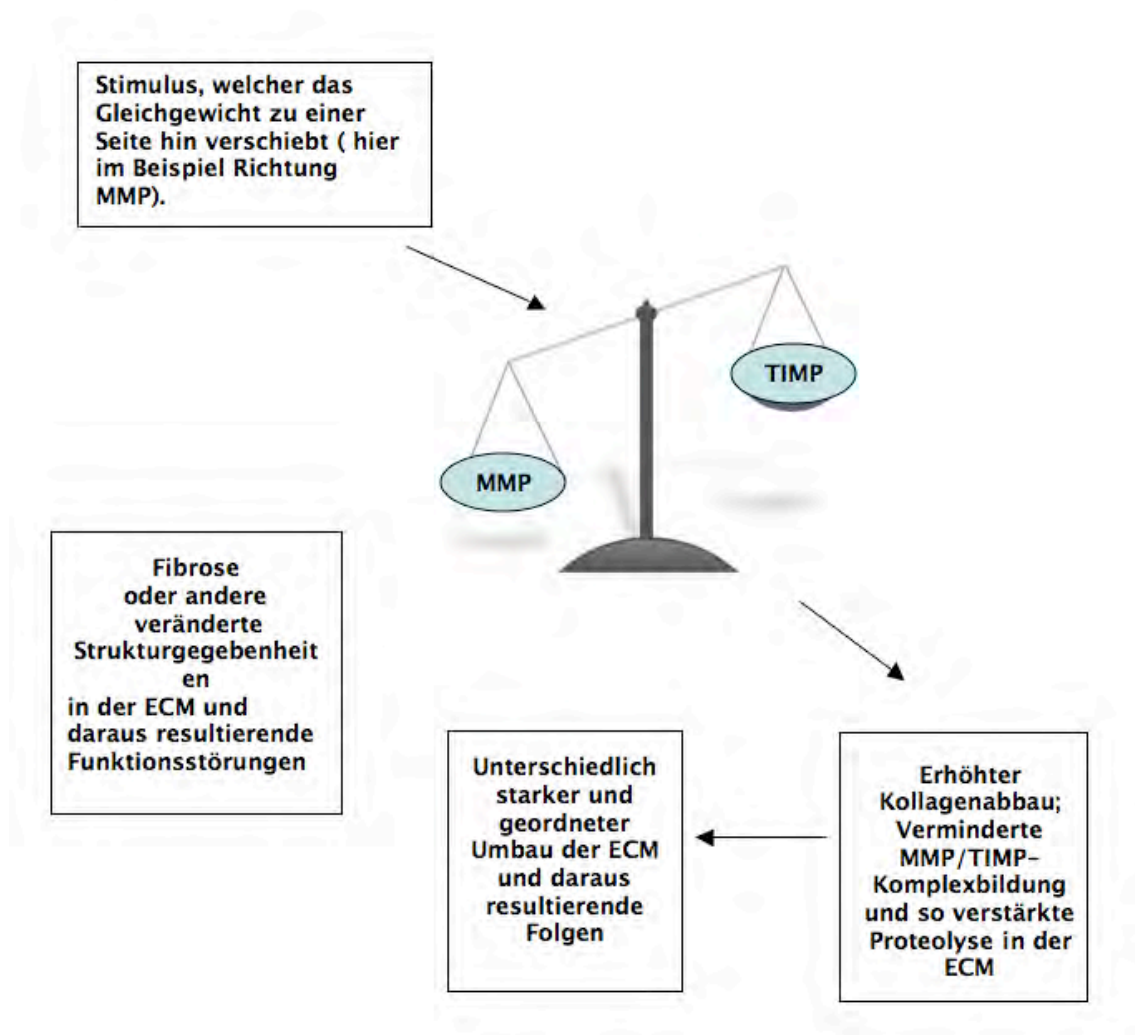


Abbildung 29 (Abb. 29) Ungleichgewicht zu Gunsten der MMPs und deren Folgen im einfachen Modell

Diese Veränderungen in der ECM sind vielfach beschrieben worden.

Meistens wurde dafür die Quantifizierung von immunhistologischen Färbungen der Kollagene zusammen mit der Beschreibung der klinischen Symptomatik benutzt. Je nach Auslegung wurde dieses Schema angewandt, um die abnormalen Umbauten zu erklären. Ich finde, dass dieses Modell nur der Anfang sein kann und in seinem Aufbau zu einfach und ungenau ist, besonders da kein ausreichender Zusammenhang von Umbau und Veränderungen in der Struktur und daraus resultierenden Gegebenheiten dargestellt wird. Durch unsere Studie und durch die daraus resultierenden Ergebnisse bin ich zur Überzeugung gekommen, dass ein anderes Schema erstellt werden sollte, welches besser die Verbindungen aufzeigen kann.

In Abbildung 30 möchte ich nun mein eigenes Schema vorstellen und anschließend erklären. Ich denke, dass das MMP/TIMP/Kollagen-System ein sehr direktes und kompliziertes Regelungs- und Stimulierungssystem ist. Alles hängt miteinander zusammen, beeinflusst sich gegenseitig, und sehr viele Faktoren können die Wirkung von MMPs und TIMPs beeinflussen.

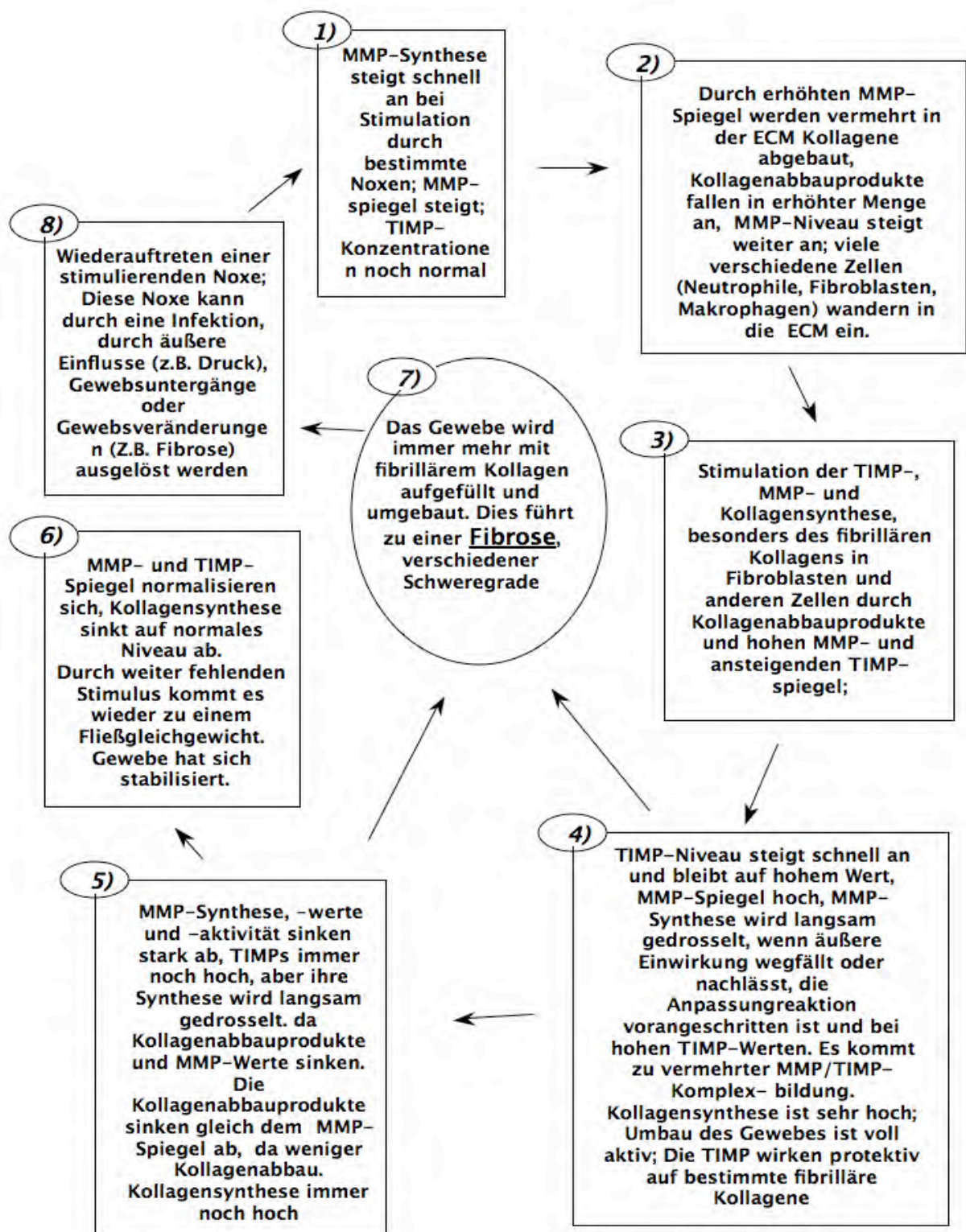


Abbildung 30 (Abb. 30) Einfache schematische Darstellung der Zusammenhänge von MMPs, TIMPs, Kollagenen und den entsprechenden Veränderungen nach unseren Vorstellungen.

4.2.1 Grundschemata des MMP/TIMP/Kollagensystems im Herzen (Abb.30)

Zu 1) Durch bestimmte Noxen, dies können z.B. eine Entzündung mit ihren Mediatoren, Wachstumsfaktoren, Zelluntergang bei Herzinfarkt, eine Ischämie, eine Hypertrophie, eine schon vorhandene Fibrose, bestimmte Pharmaka, Verletzungen durch äußere Einflüsse und vieles mehr sein, wird die MMP-Synthese in den Zellen stimuliert. Fibroblasten, Makrophagen, Myofibroblasten und andere Zellen in der ECM beginnen MMPs in größeren Mengen zu produzieren und in die ECM abzugeben. Es kommt dort zu einer raschen Aktivierung der MMPs. Die TIMP- und Kollagenproduktion ist noch normal.

Zu 2) Die Erhöhung der MMP-Spiegel in der ECM hat einen schnellen und intensiven Abbau von Kollagen zur Folge. Es fallen durch diesen Prozess viele Kollagenabbauprodukte an. Diese wiederum stimulieren direkt oder indirekt durch Mediatoren die TIMP-, MMP- und Kollagensynthese. Viele Fibroblasten, Myofibroblasten, Neutrophile und Makrophagen wandern in das Umbaugebiet ein und sorgen so für eine nochmalige Erhöhung der Produktion dieser regulierenden Faktoren. Das MMP-Niveau steigt vermutlich immer noch stark an. Langsam beginnen wahrscheinlich auch kompensatorisch der TIMP- und Kollagenspiegel zu steigen, da die verschiedenen Zellen beginnen, diese zu produzieren.

Zu 3) Vermutliche weitere Stimulation der TIMP-, MMP- und Kollagenproduktion, besonders des fibrillären Kollagens (Kollagen I und III) in Fibroblasten durch die Kollagenabbauprodukte und durch Gegenregulation der Zellen. Die TIMP-Synthese steigt wahrscheinlich immer mehr an, und die MMPs besitzen nun ihre höchste Aktivität.

Zu 4) Da jetzt die TIMP-Menge vermutlich sehr hoch ist und auch immer noch viel nachproduziert wird, kommt es zur vermehrten Bildung von MMP/TIMP-Komplexen (1:1-Bindungen). Dadurch wird die proteolytische Fähigkeit der MMPs um 75% gesenkt. Außerdem wird durch Bindung des Pro-MMPs an die TIMPs ihre Aktivierbarkeit erheblich herabgesetzt oder erschwert. Die MMP-Synthese wird gedrosselt, wenn der auslösende Reiz nachlässt, wegfällt oder die Gegenregulations- und Anpassungsreaktion vorangeschritten sind oder es zu sehr hohen TIMP-Spiegeln in der ECM kommt.

Zu diesem Zeitpunkt wird wahrscheinlich die Kollagenproduktion erhöht, um die durch die MMPs aufgelösten Strukturen zu ersetzen. Die Kollagensynthese ist jetzt auf ihrem Maximum in diesem Zyklus angekommen. Die TIMPs wirken meiner Meinung nach bei dem „Remodelling“ der ECM und in höheren Konzentrationen und bei längerem Einwirken stark protektiv auf das fibrilläre Kollagen III und nur wenig protektiv auf Kollagen I. Dadurch kommt

es zu einem vermehrten Abbau von Kollagen I und Ersetzen dieses Materials durch Kollagen III. Die ICM-BZ-Gruppe stellt hierbei eine Besonderheit dar.

Zu 5) Die MMP-Produktion und damit die proteolytische Aktivität sinken wahrscheinlich rapide ab. Der TIMP-Spiegel ist immer noch sehr hoch, nimmt aber langsam ab, da der Synthesestimulus, nämlich die Kollagenabbauprodukte, und die MMP-Werte stark abfallen. Die Produktion der TIMPs wird dadurch gedrosselt. Viele MMP/TIMP-Komplexe sind in der ECM vorhanden. Die Kollagensynthese ist zu diesem Zeitpunkt noch sehr hoch, da die Fibroblasten nicht so sensibel und schnell auf die wegfallenden oder sich reduzierenden Produktionsstimuli für Kollagene reagieren.

Zu 6) Dies ist eine der beiden Möglichkeiten, zu der es nach meinem Schema vermutlich kommen kann. Zuerst sinken die MMP-Werte auf ein normales Niveau ab, danach folgen die TIMP-Werte. Auch die überschießende Kollagensynthese normalisiert sich, und es kommt zu einer Beendigung des „Remodelling der ECM“. In Abhängigkeit von der Dauer des vorangegangenen Prozesses kann dies zu klinisch guten Ergebnissen, d.h. zu relativ geringen Störungen der Ventrikelfunktion oder sogar einer Stabilisierung des Gewebes und so zu einer Rupturprotektion führen. Dies ist nach meiner Meinung der günstigste Verlauf in diesem gesamten Prozess.

Zu 7) Die zweite Möglichkeit beinhaltet den für den Patienten weniger positiven Verlauf der Erkrankung und des „Remodellings“. Durch die überschießende Reaktion des Gewebes (Kollagenabbau und Kollagenaufbau) auf den Stimulus kann es zu einer Myokardfibrose kommen. Wie stark diese ausgeprägt ist, hängt vom Zeitraum und der Qualität der überschießenden und unkontrollierten Kollagensynthese ab. Außerdem ist hierbei sehr wichtig, wie das „Remodelling“ erfolgt ist, d.h. welche Kollagene überwiegend ab- oder eingebaut wurden. Da die verschiedenen Kollagene unterschiedliche Eigenschaften haben, ist dies essentiell für die weitere Funktion des Herzgewebes und den Schweregrad der Fibrose.

Zu 8) Jedoch kann jederzeit wieder eine stimulierende Noxe (z.B. Ischämie) auftreten oder ein chronischer Prozess (z.B. Myokarditis, DCM) vorliegen, der in einer weiteren oder andauernden Stimulation resultiert. Dies führt zu einem erneuten Start dieses Zyklus und bringt wiederum eine weitere Umstrukturierung des Gewebes mit sich. Dies erklärt das Fortschreiten einer Fibrose zum Beispiel bei einer Myokarditis oder einer DCM. Nur ist bei einem weiteren Durchgang die Ausgangsposition des Patienten eine viel schlechtere, und dieser neue Zyklus kann negative Auswirkungen haben und die linksventrikuläre Funktion weiter verschlechtern.

Man muss an diesem Schema noch Vieles entwickeln und verbessern. Vieles, was ich hier eingebaut habe, basiert auf Vermutungen und Annahmen über den Ablauf dieser Mechanismen und beinhaltet vieles, was spekulativ ist. Doch aus Allem, was ich in dieser Arbeit gefunden habe, muss ich schlussfolgern, dass meine Vorstellung und dadurch mein Schema wahrscheinlich eine einfache Darstellung der Gegebenheiten und Mechanismen darstellt. Ich stelle nicht den Anspruch, dass Alles mit diesem Schema erklärt werden kann, es soll nur das Ganze und das Verstehen dafür in einigen Punkten verbessern und klarer darstellen. Dieses Schema muss noch weiterentwickelt werden, bis es nicht mehr spekulativ ist, aber dafür brauchen wir noch viel Zeit und Forschung, bis wir ein wenig mehr von den Abläufen und Zusammenhängen der ECM, MMPs, TIMPs und Kollagensynthese kennen und verstehen.

Eine Besonderheit, die ich auch mit meinem Schema nicht erklären kann, ist die ICM-BZ, bei der anscheinend etwas protektiv auf die Kollagene I und deren Synthese wirkt. Dieses „Etwas“ kann ich leider bis heute nicht benennen oder darstellen, und es ist noch Gegenstand weiterer Forschung. Ich kann mir diese Gegebenheit nur als protektive Maßnahme der Zellen gegen Stabilitätsverlust erklären. Wie es aber zustande kommt, weiß ich leider nicht und muss hierbei spekulieren. Es könnte auch durch eine spezielle und gezielte Stimulation der Kollagen I – Synthese geschehen. Welche Stoffe im Besonderen dafür verantwortlich sind, ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch unklar.

4.3 Schlussfolgerungen und mögliche klinische Aussichten oder Blick in die Zukunft

Da wir noch zu wenig über alle diese Regulierungsmechanismen der MMPs, TIMPs und damit auch der Kollagene wissen, ist Vieles heutzutage auf diesem Gebiet spekulativ. Doch durch die weiterschreitende Forschung hierzu, ergeben sich in naher Zukunft sehr interessante Aussichten in der Therapie vieler mit MMPs, TIMPs und Kollagenen assoziierter Krankheiten. Der nächste Schritt in dieser Forschungsarbeit wird sein, die Forschungsergebnisse in eine praktische Anwendung zu überführen, auszureifen und unser Wissen zu erweitern.

Momentan gibt es Bemühungen, die Untersuchung der Rolle der TIMPs voranzutreiben.

Aber in letzter Zeit gewinnt auch der MMP-Hemmer RECK immer mehr an Bedeutung. Viele aktuelle Studien versuchen, diesen Hemmer genauer zu erforschen [52-55, 60] und seine Wirkungsmechanismen herauszufinden. Durch ihn könnte vielleicht eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung dieser Vorgänge gefunden werden.

Auch der Zusammenhang zwischen Kollagen I und dem linksventrikulären enddiastolischen Druck (LV-EDP) ist für weitere Untersuchungen äußerst interessant, da bei diesem Aspekt eine klinisch-diagnostische Zukunftsperspektive in näherer Zukunft denkbar ist. Es könnte dadurch

vielleicht eine Vorhersage über den Verlauf und die Risiken der entsprechenden Herzkrankheiten und das aktuelle Stadium des Patienten gegeben werden.

Andere Forschergruppen versuchen, auf die MMPs, TIMPs, Kollagene und damit das sogenannte „Remodelling“ durch Medikamente Einfluss zu nehmen.

So werden z.B. die Auswirkung von ACE-Hemmern und Angiotensin II-Rezeptor-Blockern auf die Aktivität der MMPs erforscht [57, 58].

Andere Medikamente wurden bereits auf diese Wirkung untersucht, so liefen Studien mit Tetracyclinen [16].

Entzündungsmediatoren und Botenstoffe, sowie deren Proteasenstimulation und ihre hemmende Wirkung sind Untersuchungsobjekte mehrerer Studien.

Wie ich in Kürze darstellen konnte, ist dieses Feld der Forschung noch sehr umfangreich und sicher in den nächsten Jahrzehnten Forschungsobjekt für unzählige Untersuchungen.

Das Ziel für die Zukunft ist, einem Erkrankten durch Gabe von MMP- und TIMP-stimulierenden oder -hemmenden Stoffen einen günstigen Krankheitsverlauf zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Es ist eine bekannte Tatsache, dass der Grad der Fibrose im insuffizienten Herzen stark erhöht ist; dieses Phänomen wird, neben Veränderungen der Myozyten, als ein wichtiger Faktor des „cardiac remodelling“ angesehen. Es fehlen jedoch vergleichende Daten zur Rolle der Ätiologie der Herzinsuffizienz, und es fehlen auch genauere Informationen zur Rolle des Metalloproteinase-Systems und seines Inhibitors bei der Entstehung der Fibrose. Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war deshalb, das Metalloproteinase-System (MMP/TIMP) und den Kollagenstoffwechsel im insuffizienten Herzen von Patienten mit dilatativer, ischämischer oder entzündlicher Kardiomyopathie zu untersuchen und die erhaltenen Werte mit Daten von Kontrollherzen zu vergleichen. Es wurden deshalb MMP-2, -8, -9, -19, TIMP-1, -2, -3, -4, verschiedene Pro-Kollagene und ihre Abbauprodukte (PINP, PIIINP, ICPT, IIINTP) und die Kollagene I und III mit immunfluoreszenzmikroskopischen Methoden quantitativ bestimmt und mit klinischen Daten in Beziehung gesetzt.

Die Untersuchungen wurden an Gewebe von Herzen durchgeführt, die im Rahmen einer Transplantation explantiert wurden. Das Gewebe wurde bei Myokarditis (MYO), sowie dilatativer (DCM) und ischämischer Kardiomyopathie (ICM) aus dem freien linken Ventrikel entnommen, aber bei der ischämischen Kardiomyopathie weiterhin in „remote zone“ (ICM-RZ) und in „borderzone“ (ICM-BZ) unterteilt. Kontrollen waren Herzen, die nicht zur Transplantation geeignet waren, oder Ventrikelgewebe von Patienten mit Mitralklappenstenose.

Nach der quantitativen Erfassung der Fluoreszenz im Mikroskop (häufig auch konfokale Mikroskopie) und nach Bearbeitung mit der Software Image J wurden die so gewonnenen Daten statistisch mit dem unabhängigen T-Test, dem Mann-Whitney U-Test oder ANOVA ausgewertet.

Die MMPs und TIMPs waren unterschiedlich stark heraufreguliert. Die Rangordnung war von hoch zu niedrig: ICM-BZ, DCM, ICM-RZ, MYO, Kontrolle für alle MMPs mit der Ausnahme von MMP9 (am höchsten bei DCM), und für die TIMPs von ICM-BZ, ICM-RZ, DCM, MYO und Kontrolle. Die Ratio zwischen allen TIMPs/alle MMPs war 1,3 in Kontrolle, 1,9 bei ICM-BZ (bei beiden höhere TIMP-Werte bei gleichem MMP), und erniedrigt zu 1,0 in den 3 anderen Krankheitsgruppen, was den Fibrosewerten ungefähr entspricht, denn Kollagen I und III variierten von ICM-BZ, DCM, ICM-RZ, MYO, Kontrolle; die Ratio zwischen beiden Kollagenen korrelierte signifikant mit dem Abfall des linksventrikulären enddiastolischen Druckes LVEDP. PINP und ICTP waren erhöht, aber im Gleichgewicht. Eine Erhöhung von PIIINP wurde nur bei DCM und ICM-RZ gefunden, das entspricht dem mäßigen Anstieg von Kollagen III und IIINTP (fertig ausgebildete, vernetzte Kollagenfibrillen).

Die folgenden Schlussfolgerungen wurden aus dieser Arbeit gezogen: Im insuffizienten Myokard unterschiedlicher Genese sind die Veränderungen des MMP/TIMP-Systems spezifisch für die verursachende Ätiologie und nicht generell eine Folge der Insuffizienz. Der Kollagenstoffwechsel, d.h. die Rate des Aufbaus und Abbaus, ist gleich für alle Gruppen, jedoch ist die Fibrose am stärksten ausgeprägt in der Randzone eines Infarktes und damit abhängig von der Ätiologie. Der hohe ICM-BZ-Wert für beide Kollagene und die erhöhte TIMP/MMP-Ratio wurden als Gegenregulation, die zur Vermeidung einer Ruptur des infarzierten Gewebes führt, interpretiert. Die funktionelle Bedeutung der Fibrose liegt in der Tatsache, dass eine deutliche Korrelation mit der Steifigkeit (Compliance) des linken Ventrikels besteht, d.h. dass bei höheren Fibrosewerten der enddiastolische Druck signifikant erhöht ist.

6. Summary

It is a known fact that the level of fibrosis is highly increased in an insufficient heart. In addition to the transformation in myocytes, this phenomenon is regarded as an important factor in “cardiac remodelling”. However, comparative data on the role of the etiology of cardiac insufficiency as well as detailed information about the role of the metalloproteinase system and its inhibitors during the development of fibrosis are still not available. Therefore, the aim of this study was to examine the metalloproteinase system (MMP/TIMP) and the metabolism of collagen in the insufficient hearts of patients suffering from dilative, ischemic or inflammatory cardiomyopathy and to compare the results with data from control hearts. Hence, using immunofluorescence microscopic methods, MMP-2, -8, -9, -19, TIMP-1, -2, -3, -4, various pro-collagens and their waste products (PINP, PIIINP, ICPT, IIINTP) and collagens I and III were determined quantitatively and compared with clinical data.

The studies were performed on tissue obtained from hearts, which were explanted during transplantations. In the case of myocarditis (MYO) as well as dilative (DCM) and ischemic cardiomyopathy (ICM), tissue was removed from the free left ventricular wall. For the examination of ischemic cardiomyopathy, the removed tissue was, furthermore, subdivided into “remote zone” (ICM-RZ) and “border zone” (ICM-BZ). Controls were conducted on hearts, which were not suitable for transplantation or on ventricular tissue obtained from patients suffering from mitral stenosis.

After quantitatively measuring the fluorescence by means of the microscope (often confocal microscopy) and processing it with Software Image J, the resulting data was evaluated statistically by using the independent T-Test, the Mann-Whitney U-Test or ANOVA.

The up-regulation of MMPs and TIMPs varied strongly. The high to low ranking was as follows: ICM-BZ, DCM, ICM-RZ, MYO, controls for all MMPs with the exception of MMP-9 (highest in DCM), and for the TIMPs of ICM-BZ, ICM-RZ, DCM as well as MYO and

controls. The ratio between all TIMPs/all MMPs was 1.3 in controls, 1.9 in ICM-BZ (both showed increased TIMP-levels while MMP-levels remained constant) and decreased to 1.0 in the three other disease groups, which approximately corresponded to the rate of fibrosis, because collagen I and III ranged from ICM-BZ, DCM, ICM-RZ, MYO to controls. The ratio between both collagens correlated significantly with the decrease of the left ventricular end-diastolic pressure LVEDP. PINP and ICTP were increased but the ratio was decreased. An increase of PIIINP was only found in DCM and ICM-RZ, which complies with the moderate increase of collagen III and IIINTP (mature cross-linked collagen fibrils).

The following conclusions were drawn from this study: The alterations in the MMP/TIMP system in failing myocardium are specific for the etiology of heart failure and, in general, not a consequence of the insufficiency itself. The metabolism of collagen, i.e. the degree of synthesis and degradation, is similar for all groups. However, fibrosis is most distinctive in the border zone of an infarct and, therefore, dependent on etiology. The high ICM-BZ level for both collagens and the increased TIMP/MMP ratio were interpreted as a regulative force in order to avoid a rupture of the infarcted tissue. The functional significance of fibrosis is shown by the fact that there is a clear correlation with the compliance of the left ventricle, i.e. when fibrosis levels are increased, the end-diastolic pressure is also elevated distinctly.

7. Anhang/Rezepte

7.1 Rezept 1: Objektträger beschichten

Um eine bessere Haftung der Schnitte auf der Glasfläche zu erreichen, wurden diese mit einer Silikonmischung beschichtet.

Es wurde als erstes eine ausführliche Waschung durchgeführt:

1. 30 min in heißem Wasser mit dafür geeignetem Spülmittel.
2. 15 min unter fließendem Wasser abwaschen.
3. 10 min unter fließendem Aqua dest. abwaschen.
4. Ausgiebig abtropfen lassen.
5. Über Nacht im Wärmeschränk bei 42 C° trocknen.

Danach wurden sie beschichtet:

6. 5 Sek. in 3-Aminopropyltriethoxy-Silane (SIGMA) mit Aceton (2:100) eintauchen.
7. In reines Aceton einmal eintauchen.
8. Zweimaliges Eintauchen in Aqua dest..
9. Über Nacht im Wärmeschränk bei 42 C° trocknen.

Um eine Verunreinigung zu vermeiden, wurden diese Objektträger in staubfreien Kammern aufbewahrt.

7.2 Rezept 2: Carnoy`s Lösung

Hierbei wurden drei chemische Verbindungen benötigt, verwendet und vermischt.

- | | |
|-----------------|-------|
| 1. Ethanol abs. | 60 ml |
| 2. Chloroform | 30ml |
| 3. Eisessig | 10ml |

7.3 Rezept 3: PBS-Lösung

Für die Herstellung der PBS-Lösung (Phosphate balanced salt solution) wurden nachfolgende Zutaten verwendet:

1. Stocklösung:

5 Liter Aqua dest. + a) 397,4 g NaCl + b) 10,0 g KCl +
c) 10,0 g KH_2PO_4 + d) 88,75 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$

2. PBS-Gebrauchslösung:

4,5 Liter Aqua dest. + 0,5 Liter Stocklösung

Als letzter Schritt muss der PH-Wert noch genau auf 7,4 eingestellt werden.

7.4 Rezept 4: Mowiol-Einbettmedium

Mowiol wurde als Einbettungsmedium für die histologischen Schnitte verwendet.

Herstellung und Zusammensetzung:

1. 4 ml PBS-Lösung + 1 g Mowiol 16 Stunden miteinander verrühren.
2. 2 ml H_2O -freies Glycin zugeben und wieder 16 Stunden verrühren lassen.
3. 15 min bei 12000 rpm zentrifugieren
4. Überstand abgießen.
5. Mowiol ist zur Verwendung bereit

Das Mowiol wurde bei Nichtverwendung im Kühlschrank bei $+4^\circ\text{C}$ gelagert.

8. Literaturverzeichnis

- [1] **Albert, B; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Roberts, J.D.; Watson, J.D.**
1990 Molekularbiologie der Zelle
- [2] **Kähäri, V.M.; Saarialho-Kere U.**
1997 Matrix metalloproteinases in Skin. Exp.
Dermatol, 6: 199 – 213
- [3] **Shapiro, S.D.**
1998 Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: Biological consequences.
Curr Opin Cell Biol, 10: 602-608
- [4] **Woessner, J.F.**
1998 The matrix metalloproteinase family. In: Parks, W.C., Mecham R.P. (Hrsg).
Matrix Metalloproteinases.
San Diego: Academic Press: 1-14
- [5] **Gross, J.; Nagai, Y.**
1965 Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme.
Proc Natl Acad Sci USA, 54: 197-204
- [6] **Somerville R.P.; Oblander S.A.; Apte S.S.**
2003 Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks.
Genome Biol, 4: 216.1-216.11
- [7] **Sternlicht M.D.; Werb Z.**
2001 How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour
Annu Rev Cell Dev Biol, 17: 463-516
- [8] **Springmann, E.B.; Angleton, E.L.; Birkedal-Hansen, H.; Van Wart, H.E.**
1990 Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys active-site zinc complex in latency and a “cysteine switch” mechanism for activation.
Proc Natl Acad Sci, 87: 364 – 368
- [9] **Basset, P.; Okada, A.; Chenard, M.P. et al.**
1997 Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression:

Therapeutical implications.
Matrix Biol, 15: 535-541

[10] **Johnsen, M.; Lund, L. R.; Romer, J.; Almholt, K.; Dano K.**

1998 Cancer invasion and tissues remodelling: Common themes in proteolytic matrix degradation.
Curr Opin Cell Biol, 10: 667-671

[11] **Murphy, G.; Knäuper, V.**

1997 Relating matrix metalloproteinase structure to function: Why the 'hemopexin' domain?
Matrix Biol, 15: 511 – 518

[12] **Nagase, H.; Visse, R.; Murphy, G.**

2006 Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.
Cardiovasc Res, 69: 562-573

[13] **Gomez, D. E.;Alonso, D. F.; Yoshiji, H.; Thorgeirson, U. P. C.**

1997 Tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, regulation and biological functions.
Eur J. Cell Biol, 74: 111-122

[14] **Gatsios, P; Haubeck, M. D.; Van De Leur, E.; Frisch, W.; Apte, S. S.; Greiling M.; Heinrich, P. J.; Clark, N.; Murphy, G.**

1996 Oncostatin M differentially regulates tissue inhibitors of metalloproteinases
TIMP-1 and TIMP-3 gene expression in human synovial lining cells.
Eur J Biochem, 241: 56-63

[15] **Manello, G.; Gazzanelli, G.**

2001 Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications.
Apoptosis, 6: 479-482

[16] **Reddy HK; Tjahja IE; Campbell SE; Janicki JS; Hayden MR; Tyagi SC**

2004 Expression of matrix metalloproteinase activity in idiopathic dilated cardiomyopathy: a marker of cardiac dilatation.
Mol Cell Biochem, 264:183-191

[17] **Baudino TA; Carver W; Giles W; Borg TK**

2006 Cardiac fibroblasts: friend or foe?

[18] **Gerd Herold**

2006 Lehrbuch der Inneren Medizin

[19] **Spinale FG; Coker ML; Heung LJ; Bond BR; Gunasinghe HR; Etoh T, Goldberg AT; Zellner JL; Crumbley AJ.**

2000 A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure.

Circulation, 102: 1944-1949

[20] **Yokseki O; Yazaki Y; Suzuki J; Imamura H; Takenaka H; Isobe M.**

2000 Association of matrix metalloproteinase expression and left ventricular function in Idiopathic dilated cardiomyopathy.

JPN Circ J, 64: 352-357

[21] **R. English Chapman: Francis G. Spinale**

2004 Extracellular protease activation and unravelling of the myocardial interstitium: critical steps toward clinical applications.

Am J Physiol Heart Circ Physiol, 286: H1-H10

[22] **Pauschinger M.; Knopf D.; Petschauer S.; Doerner A.; Poller W.; Schwimmbeck PL.; Kühl U.; Schultheiss H.-P.**

1999 Dilated Cardiomyopathy is Associated with significant Changes in Collagen Type I/III ratio.

Circulation, 99: 2750-2756

[23] **Deschamps AM; Spinale FG**

2005 Matrix modulation and heart failure: new concepts question old belief.

Curr Opin Cardiol, 20: 211-216

[24] **Li J; Schwimmbeck PL.; Tschöpe C; Leschka S.; Husmann L.; Rutschow S.; Reichenbach F.; Noutsias M.; Kobalz U.; Poller W.; Spillmann F.; Zeichenhardt H.; Schultheiss HP.; Pauschinger M.**

2002 Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinases in association with inflammatory induction.

Cardiovasc Res, 56: 235-247

[25] **Pauschinger M.; Rutschow S.; Chandrasekharan K.; Westermann D.; Weitz A.; Schwimmbeck PL.; Zeichenhardt H.; Poller W.; Noutsias M.; Li J.;**

Schultheiss HP.; Tschöpe C.

2005 Carvedilol improves left ventricular function in murine coxsackievirus-induced acute myocarditis. Association with reduced myocardial interleukin-1beta and MMP-8 expression and a modulated immune response.

Eur J Heart Fail, 7: 444-452

[26] **Meng XH.; Wang Y.; Zhuang JX.; Han XZ.; Chen Y.; Jin YP.; Wang YL.; Yu YH.; Spires JP.; Song GJ.**

2004 Dynamic changes in myocardial matrix metalloproteinase activity in mice with viral myocarditis.

Chin Med J (Engl), 117:1195-1199

[27] **Rutschow S.; Jun Li; Schultheiss HP.; Pauschinger M.**

2006 Myocardial proteases and matrix remodelling in inflammatory heart disease
Cardiovasc Res, 69: 646-656

[28] **Li YY.;Feldman AM.; Sun Y.; McTiernan CF.**

1998 Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart.

Circulation, 98:1728-1734.

[29] **Moshal KS.; Tyagi N.; Moss V.; Henderson B.; Steed M.; Ovechkin A.; Aru GB.; Tyagi SC.**

2005 Early induction of matrix metalloproteinase-9 transduces signaling in human heart end stage failure.

J Cell Mol Med, 9:704-713.

[30] **Etoh T.; Joffs C.; Deschamps AM.; Davis J.; Dowdy K.; Hendrick J.; Baicu S.; Mukherjee R.; Manhaini M.; Spinale FG.**

2001 Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs.

Am J Physiol Heart Circ Physiol, 281:H987-H994.

[31] **Lindsey ML.**

2004 MMP induction and inhibition in myocardial infarction.

Heart Fail Rev, 9: 7-19.

- [32] **Mukherjee R.; Brinsa TA. ; Dowdy KB.; Scott AA.; Baskin JM.; Deschamps AM.; Lowry AS.; Escobar GP.; Lucas DG.; Yarbrough WM.; Zile MR.; Spinale FG.**
2003 Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition.
Circulation, 107: 618-625.
- [33] **Yarbrough WM.; Mukherjee R.; Brinsa TA.; Dowdy KB.; Scott AA.; Escobar GP.; Joffs C.; Lucas DG.; Crawford FA.; Jr., Spinale FG.**
2003 Matrix metalloproteinase inhibition modifies left ventricular remodelling after myocardial infarction in pigs.
J Thorac Cardiovasc Surg, 125: 602-610.
- [34] **Wilson EM.; Moainie SL.; Baskin JM.; Lowry AS.; Deschamps AM.; Mukherjee R.; Guy TS.; St John-Sutton MG.; Gorman JH. 3rd; Edmunds LH. Jr.; Gorman RC.; Spinale FG.**
2003 Region- and type-specific induction of matrix metalloproteinases in postmyocardial infarction remodelling.
Circulation, 107: 2857-2863.
- [35] **Hojo Y, Ikeda U, Ueno S, Arakawa H, Shimada K.**
2001 Expression of matrix metalloproteinases in patients with acute myocardial infarction.
Jpn Circ J, 65: 71-75.
- [36] **Deten A.; Marx G.; Briest W.; Volz HC.; Zimmer HG.**
2005 Heart function and molecular biological parameters are comparable in young adult and aged rats after chronic myocardial infarction.
Cardiovasc Res, 66: 364-373
- [37] **Janssens S.; Lijnen HR.**
2006 What has been learned about the cardiocascular effects of matrix metalloproteinases from mouse models.
Cardiovasc Res, 69: 585-594
- [38] **Murphy G.; Knäuper V.; Cowell S.; Hembry R.; Stanton H.; Butler G.; Freije J.; Pendas AM.; Lopez-Otin C.**
1999 Evaluation of some newer matrix metalloproteinases.
Ann N Y Acad Sci, 878: 25-39.

- [39] **Stracke JO.; Hutton M.; Stewart M.; Pendas AM.; Smith B.; Lopez-Otin C.; Murphy G.; Knäuper V.**
 2000 Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme.
 J Biol Chem, 275: 14809-14816.
- [40] **Manso AM.; Elsherif L.; Kang SM.; Ross RS.**
 2006 Integrins, membrane-type matrix metalloproteinases and ADAMs: Potential implications for cardiac remodeling.
 Cardiovasc Res, 69: 574-584
- [41] **Le Maitre CL; Pockert A.; Buttle DJ. ; Freemont AJ. ; Hoyland JA.**
 2007 Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration
 Biochem Soc Trans, 35: 652-655
- [42] **Deschamps AM; Spinale FG**
 2006 Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure:
 Bioactive molecules and transcriptional regulation
 Cardiovasc Res, 69: 666-679
- [43] **Nagase H.; Woessner JF.**
 1999 Matrix metalloproteinases
 J Biol Chem, 274: 21491-21494
- [44] **Deten A.; Marx G.; Briest W.; Volz HC.; Zimmer HG.**
 2005 Heart function and molecular biological parameters are comparable in young adult and aged rats after chronic myocardial infarction
 Cardiovasc Res, 66: 364-373
- [45] **Polyakova V.; Hein S.; Kostin S.; Ziegelhoeffer T.; Schaper J.**
 2004 Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression.
 J Am Coll Cardiol, 44: 1609-1618
- [46] **Renz-Polster; J. Braun**
 2001 Basislehrbuch Innere Medizin, Urban&Fischer ; 2. Auflage
- [47] **Eriksen H.A.; Satta J.; Risteli J.; Veijola M.; Väre P.**

2006 Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve
Atherosclerosis, 189: 91-98

[48] **Shu Ye**

2006 Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome
Cardiovasc Res, 69: 636-645

[49] **Bode MK, Soini Y, Melkko J, Satta J, Risteli L, Risteli J.**

2000 Increased amount of type III pN-collagen in human abdominal aortic aneurysms: evidence for impaired type III collagen fibrillogenesis.
J Vasc Surg, 32: 1201–1217.

[50] **Querejeta R.; Lopez B.; Gonzales A.; Sanchez E. ; Larman M. ; Martinez Ubago JL. ; Diez J.**

2004 Increased collagen Type I synthesis in patient with heart failure of hypertensive origin: Relation to myocardial fibrosis
Circulation, 110: 1263-1268

[51] **D'Armiento J.**

2002 Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction
Trends Cardiovasc Med, 12: 97-101

[52] **Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M.**

1998 Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK
Proc Natl Acad Sci USA, 95: 13221–13226.

[53] **Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C.**

2003 RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signalling to extracellular matrix remodeling.
Cancer Metastasis Rev, 22: 167–175.

[54] **Echizenya M, Kondo S, Takahashi R, Oh J, Kawashima S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M.**

2005 The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors.

Oncogene, 24: 5850–5857.

- [55] **Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M.**

2001 The membrane anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis

Cell, 107: 789–800

- [56] **Thomas CV.; Coker ML.; Zellner JL.; Handy JR.; Crumbley AJ. 3rd; Spinale FG.**

1998 Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with endstage dilated cardiomyopathy

Circulation, 97: 1708-1715

- [57] **Jin Y.; Han HC.; Lindsey ML.**

2007 ACE inhibitors to block MMP-9 activity: New functions for old inhibitors

J Mol Cell Cardiol, 43: 664-666

- [58] **Yamamoto D, Takai S, Jin S, Tanaka K, Miyazaki M.**

2007 Molecular mechanism of imidapril for cardiovascular protection via inhibition of MMP-9.

J Mol Cell Cardiol, 43: 670–676.

- [59] **Matsumori A.**

1996 Cytokine in myocarditis and cardiomyopathies

Curr Opin Cardiol, 11: 3002-3009

- [60] **Polyakova V.; Miyagawa S.; Szalay Z.; Risteli J.; Kostin S.**

2008 Atrial extracellular matrix remodelling in patients with atrial fibrillation

J Cell Mol Med, 12: 189-208

- [61] **Francis G. Spinale**

2007 Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases:

Influence on Cardiac Form and Function

Physiol Rev, 87: 1285-1342

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

10. Danksagung

Hier möchte ich all denen danken, ohne die ich diese Arbeit nicht geschafft und geschrieben hätte.

Besonderer Dank gilt:

Frau Professor Dr. Dr. h.c. Schaper, die mich immer unterstützt und geleitet hat. Sie war die gute Seele und Chefin hinter dem Ganzen.

Ohne meinen Doktorvater PD. Dr. Sawa Kostin hätte ich nie soviel Einblicke in die Forschung nehmen und meine Forschungsarbeit machen können. Ich werde mich immer gerne an unsere gemeinsame Zeit im Labor zurück erinnern.

Frau Prof. Dr. Schaper und PD. Dr. Sawa Kostin für die Übertragung dieses interessanten Forschungsthemas und die intensive und herzliche Betreuung während der gesamten Dissationsarbeit, sowie die optimalen Arbeitsbedingungen in der Arbeitsgruppe.

Der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. für die guten Arbeitsbedingungen und Unterstützung während dieser Zeit.

Frau Beate Grohmann, Frau Carmen Büttner, Frau Brigitte Mätzke und Renate Mähren für die Einführung in die technischen Mittel, die Hilfe bei diversen Problemen und ein tolles Arbeitsklima.

Frau Viktoria Polyakova für die optimale Einarbeitung in dieses Thema und die umfangreiche Unterstützung durch Wissen und Tipps bei technischen Dingen.

Herrn Dr. Sebastian Dammer und Dr. Markus Rieger für das einzigartige kollegiale Arbeitsklima und die vielen hilfreichen Diskussionen während dieser Zeit.

Meinen Eltern und Geschwistern (Kai und Angelika), welche immer hinter mir standen, mich immer motiviert und nach allen Kräften unterstützt haben.

Und vielen anderen, welche ich hier noch erwähnen möchte:

Prof. Dr. Dreyer, Prof. Dr. Brockmeier, Micky Löffler, Mischa Socher, Alex Grimm, Stefanie Kornelsen, Johannes Hallquist, Herrn und Frau Dr. Beckmann, Familie Ketelsen, Hauke Philip, Nele Rensing, meiner restlichen Familie, Kläre Stach und noch alle die ich nicht genannt habe, aber nennen wollte.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind eingehalten.